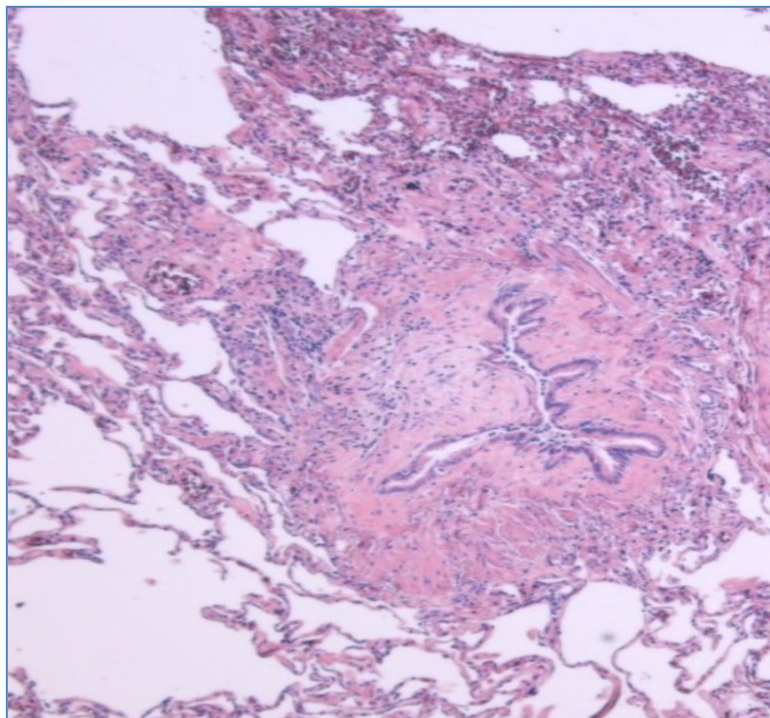


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
TESIS DOCTORAL**



**UTILIDAD CLÍNICA DEL ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS Y  
LAS CITOQUINAS EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR  
DE PACIENTES CON DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL  
INJERTO PULMONAR**



**TESIS DOCTORAL  
ROSALÍA LAPORTA HERNÁNDEZ  
2017**

© Rosalía Laporta Hernández, 2017

[roslaporta@gmail.com](mailto:roslaporta@gmail.com)

**PIEDAD USSETTI GIL**, Doctora en Medicina, Jefa del Servicio de Neumología del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Madrid, en calidad de Director del Trabajo de Tesis Doctoral titulado

**“UTILIDAD CLINICA DEL ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS Y LAS CITOQUINAS  
EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR  
DE PACIENTES CON DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO PULMONAR”,**

presentado por Rosalía Laporta Hernández, para optar al Grado de Doctor

CERTIFICA

que es un trabajo original de investigación sobre un tema de interés clínico que cumple con los requisitos legales, de metodología y rigor científico y aportaciones originales, para constituir un trabajo de Tesis Doctoral.

En Madrid, a veinte de Junio de 2017.

Prof. Piedad Ussetti Gil

**ROSALIA LAPORTA HERNÁNDEZ**

**TITULO: UTILIDAD CLÍNICA DEL ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS Y LAS CITOQUINAS EN EL LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES CON DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO PULMONAR**

**DIRECTOR:**

Prof. Dra. **PIEDAD USSETTI GIL**, JEFE DEL SERVICIO  
DE NEUMOLOGIA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO  
PUERTA DE HIERRO DE MADRID

**TRIBUNAL:**

PRESIDENTE: ANDRES VARELA DE UGARTE  
SECRETARIO: JUAN ANTONIO VARGAS NUÑEZ  
RESTO DE MIEMBROS: JAVIER ALBERTO CARBONE  
CAMPOVERDE, AMPARO SOLÉ JOVER, M<sup>º</sup>ASUNCIÓN  
NIETO BARBERO, RAQUEL CASTEJÓN DIAZ, JOSE  
MANUEL CIFRIAN MARTINEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
2017

***A mis padres, a mis hijos  
A Oliver***

## ***Agradecimientos***

Me enfrento a esta larga hoja en blanco e intentaré reflejar y plasmar en palabras lo que siento, porque hay muchas personas que de una u otra manera me han ayudado a concluir este trabajo, la tesis doctoral.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a Piedad Ussetti, este proyecto ha salido adelante gracias a ti. Tu fuerza y confianza ha sido mi gran apoyo. Este trabajo representa todo un camino que comenzó hace muchos años, he crecido de tu mano, firme, sabia, inquieta y sobre todo humana. Me has contagiado de tu dedicación, tu respeto y tu curiosidad sobre todo en el mundo del trasplante, aunque lo puedo trasladar en cualquier ámbito de mi vida. Gracias por tu cercanía y por enseñarme no solo a hacerme preguntas sino a creer que puedo participar en las respuestas.

Gracias a todas las personas que trabajan en el laboratorio de Medicina y me han ayudado en la recogida de datos. Por los consejos y ánimos de M<sup>o</sup> Jesús Citores, Silvia Rosado y especialmente a Raquel Castejón, sin tu ayuda hubiera sido infinitamente más complicado.

Gracias también a todos los compañeros del servicio de neumología que me han ayudado estos últimos meses y me han facilitado el trabajo, sobre todo tú, Myriam. Gracias a ti y a Víctor por vuestra infinita paciencia, amistad y poder contar con vosotros, incluso en horas intempestivas.

A ti Antolín, gracias por tu espíritu crítico constante que nos hace mejorar.

A Juani, gracias por tu continúa ayuda, tu alegría y tu amistad.

Agradezco la disponibilidad y apoyo de Ana Rayuela

A Clara Salas gracias por entusiasmar me, acercarme y enseñarme la histología de nuestros pacientes.

A Ana Noblejas mi amiga y compañera de fatigas. Gracias por tu sincero y gran apoyo.

A Javier Carboné gracias por tu tiempo, tu ánimo y tus válidas aportaciones.

Debo agradecer a personas que han sido importantes en mi carrera profesional y su confianza y apoyo han contribuido de alguna forma en este trabajo, M<sup>a</sup> José Ferreiro y Andrés Varela.

A mis padres por su apoyo incondicional que me ha llevado a ser lo que soy, papa estés donde estés sé lo orgulloso que te sentirás. A mis hermanas, María, Ana y a ti peque Paula os quiero.

A mi tía Anuncia desde el principio he recibido todo tu apoyo y cariño.

A mis hijos, os lo dedico sois mi vida, prometo devolver las horas robadas.

A ti Oli, amor y compañero.



## ***Abreviaturas***

---

Abreviatura	Significado
Ac	Anticuerpo
AEC	Células epiteliales de la vía aérea
APC	Célula presentadora de antígeno
BAL	Lavado broncoalveolar
BO	Bronquiolitis obliterante
BOS	Bronchiolitis obliterans syndrome
CD	Células dendríticas
CLAD	Chronic lung allograf disfunction
CMV	Citomegalovirus
Col V	Colágeno tipo V
DSA	Donor-specific antibodies
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
FEV1	Forced expiratory volume 1
FBS	Fibrobroncoscopia
FVC	Forced vital capacity
HLA	Anti-human leukocyte antigen
IFN	Interferón
IL	Interleucina
ISHLT	International society for heart lung transplantation
KIR	receptores inhibidores de muerte
IP-10	Interferon gamma-induced protein 10
MHC	Major histocompatibility complex
MIG	Monokine induced by gamma interferón
NCR	Receptor de citotoxicidad

NK	Natural killer
ONT	Organización nacional de trasplantes
PMN	Polimorfonucleares
PRR	Receptores de reconocimiento
RA	Rechazo agudo
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RAS	Restrictive allograft síndrome
RGE	Reflujo gastroesofágico
TAC	Tomografía computarizada
TCR	Receptor de linfocito T
TGF	Transforming growth factor beta
TLC	Total lung capacity
TNF	Tumor necrosis factor
TLR	Receptores “toll like”
Treg	Células T reguladoras

***Resumen***

---

La Disfunción crónica del injerto (CLAD) o rechazo crónico produce deterioro progresivo de la función pulmonar y afecta a más del 50% de los receptores de trasplante a los 5 años de la intervención. No tiene tratamiento eficaz y es la principal causa de mortalidad a largo plazo de dichos pacientes.

La secuencia patogénica de la CLAD es compleja y en gran parte desconocida. Una vez establecida es irreversible y en la mayoría de los casos evolutiva, por tanto, la identificación de precursores del rechazo crónico puede ayudar a realizar estrategias que frenen la progresión de la enfermedad, antes del deterioro del injerto. En este sentido, el lavado broncoalveolar (BAL) es una técnica diagnóstica que nos permite estudiar el perfil celular y bioquímico del espacio alveolar. Diversos estudios han analizado la utilidad del BAL para la predicción y el diagnóstico de la CLAD, pero ninguno de ellos ha demostrado la suficiente evidencia para ser aceptado clínicamente. Por ello, son necesarios más estudios que nos ayuden a conocer mejor la patogénesis de la CLAD e identificar biomarcadores predictores de progresión de la enfermedad y/o de su respuesta al tratamiento.

## HIPÓTESIS

La composición celular y el perfil de citoquinas en el lavado broncoalveolar es un reflejo del microambiente inflamatorio del parénquima pulmonar y su monitorización puede ser una herramienta útil para el diagnóstico del rechazo crónico y predecir su posterior progresión.

## OBJETIVO PRINCIPAL:

Analizar el perfil de células y citoquinas del BAL en receptores de trasplante pulmonar que desarrollan rechazo crónico del injerto y su asociación con la progresión de la disfunción.

## OBJETIVOS SECUNDARIOS:

1. Comparar el perfil de células y de citoquinas en muestras del BAL antes y después del desarrollo de rechazo crónico
2. Correlacionar los niveles de citoquinas y el porcentaje de células antes y después del desarrollo de rechazo crónico
3. Correlacionar el deterioro de la función pulmonar con las células y citoquinas en el BAL antes y después del rechazo crónico

## MATERIAL Y MÉTODOS:

Estudio retrospectivo de la evolución funcional (Volumen Espiratorio Forzado en el primer segundo: FEV1) de los 27 receptores de trasplante pulmonar con rechazo crónico. Análisis de la celularidad por citometría de flujo y de las citoquinas mediante ELISA en las muestras de BAL obtenidas en fibrobroncoscopia (FBS) realizada antes de desarrollar CLAD y tras el diagnóstico de la misma. Análisis de la correlación entre las distintas células y citoquinas, y entre las mismas y la evolución de la función pulmonar (FEV1) antes y después del diagnóstico de la CLAD.

## RESULTADOS:

Tras el desarrollo del rechazo crónico observamos aumento significativo de citoquinas proinflamatorias (IL-8, IL-6), citoquinas quimiotácticas (MCP-1, IP-10, MIG, RANTES) y alteración celular con incremento del porcentaje de neutrófilos y linfocitos. A nivel celular observamos una correlación inversa entre neutrófilos y macrófagos, y una correlación positiva entre el subtipo de linfocitos CD4 activos (CD25) y linfocitos CD4 de memoria (CD45RO). La IL-8 se correlacionó positivamente con los neutrófilos, las células NK bright (CD56+CD16-) y las células CD19.

Los niveles de IL-6 fueron significativamente mayores en los pacientes con pérdida acelerada de la función pulmonar en el momento del diagnóstico del BOS.

## CONCLUSIÓN:

Tras el desarrollo de rechazo crónico se observaron cambios significativos en el perfil de células y citoquinas del BAL.

El aumento de neutrófilos y de la IL-8 refleja actividad inflamatoria en el microambiente pulmonar en probable relación con la lesión en la célula epitelial y remodelado de la vía aérea.

La monitorización de células y citoquinas en el BAL de los receptores de trasplante pulmonar puede ser útil para el reconocimiento precoz de la disfunción tardía del injerto y su evolución posterior.

## PALABRAS CLAVE

Trasplante pulmonar

Rechazo crónico

Disfunción crónica del injerto

Síndrome de bronquiolitis obliterante del injerto

Citoquinas

Células

Lavado broncoalveolar

Diagnóstico precoz



## ***Índice***

---

1	INTRODUCCIÓN	1
2	DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO	5
2.1	SÍNDROME DE BRONQUIOLITIS OBLITERANTE	5
2.2	MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS	10
2.2.1	Respuesta Aloinmune	13
2.2.2	Respuesta Inmune Innata	24
2.2.3	Respuesta Autoinmune	26
2.3	ANÁLISIS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR	26
2.3.1	Composición celular	28
2.3.2	Citoquinas	30
2.4	JUSTIFICACIÓN	33
3	HIPÓTESIS	35
4	OBJETIVOS	37
5	MATERIALES Y MÉTODOS	39
5.1	POBLACIÓN	39
5.2	PROTOCOLO DE ESTUDIO	43
5.2.1	Diseño del estudio	
5.2.2	Plan de trabajo	
5.3	MATERIAL	43
5.3.1	Pruebas de función pulmonar	
5.3.2	Broncoscopia	
5.4	MÉTODO	49
5.4.1	Medida de la composición celular	

5.4.2	Medida de las citoquinas en el BAL	
5.5	VARIABLES ANALIZADAS	52
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
5.7	ASPECTOS ÉTICOS	54
6	RESULTADOS	55
6.1	DESCRIPCIÓN DE LA POBLACIÓN	55
6.2	ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN PULMONAR	56
6.3	RESULTADOS DEL ANÁLISIS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR	59
6.3.1	Composición celular	59
6.3.2	Citoquinas	63
6.3.3	Análisis de correlaciones	67
7	DISCUSIÓN	85
8	CONCLUSIONES	93
9	BIBLIOGRAFÍA	95
10	ANEXOS	105

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Clasificación de los factores de riesgo implicados en el desarrollo de la disfunción crónica del injerto	11
<b>Tabla 2</b>	Grado de severidad del rechazo celular agudo	20
<b>Tabla 3</b>	Grados de severidad de la afectación de la vía aérea	22
<b>Tabla 4</b>	Criterios diagnósticos del rechazo mediado por anticuerpos	23
<b>Tabla 5</b>	Principales células y citoquinas implicadas en el desarrollo de bronquiolitis obliterante	28
<b>Tabla 6</b>	Características clínicas de los pacientes	41
<b>Tabla 7</b>	Seguimiento del FEV1 antes y después del desarrollo del rechazo crónico	45
<b>Tabla 8</b>	Fecha del BAL registrado antes y después del diagnóstico de rechazo crónico	48
<b>Tabla 9</b>	Análisis de la poblaciones celulares por citometría de flujo	50
<b>Tabla 10</b>	Características demográficas de los pacientes	55
<b>Tabla 11</b>	Valor medio del FEV1 en el seguimiento del paciente	56
<b>Tabla 12</b>	Características demográficas de los pacientes en función del descenso de la función pulmonar después del desarrollo del rechazo crónico	57
<b>Tabla 13</b>	Valor medio del FEV1 en función de la pendiente de progresión del FEV1 fuera mayor o menor del 20%	58
<b>Tabla 14</b>	Datos analizados de las células del BAL de los pacientes antes y después del rechazo crónico	59
<b>Tabla 15</b>	Análisis de las subpoblaciones de los linfocitos	62
<b>Tabla 16</b>	Valor de las citoquinas antes y después del rechazo crónico	63
<b>Tabla 17</b>	Análisis de la correlación entre citoquinas	67
<b>Tabla 18</b>	Análisis de la correlación entre las células	68
<b>Tabla 19</b>	Análisis de la correlación entre los subtipos de linfocitos T	70

<b>Tabla 20</b>	Análisis de la correlación entre subtipos de linfocitos T	71
<b>Tabla 21</b>	Análisis de la correlación entre células y citoquinas	73
<b>Tabla 22</b>	Análisis de la correlación entre células y citoquinas	74
<b>Tabla 23</b>	Análisis de la correlación entre la IL-8 y las células	75
<b>Tabla 24</b>	Análisis de la correlación entre la IL-6 y las células	78
<b>Tabla 25</b>	Análisis de la correlación entre la MIG y las células	79
<b>Tabla 26</b>	Análisis de la correlación entre la RANTES y las células	80
<b>Tabla 27</b>	Valor de la IL6 en el momento del diagnóstico de BOS	83

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Enfermedad de base de los pacientes trasplantados en España durante el año 2016.	2
<b>Figura 2</b>	Supervivencia de pacientes adultos con Trasplante pulmonar a nivel internacional	3
<b>Figura 3</b>	Causas de mortalidad del Trasplante Pulmonar	4
<b>Figura 4</b>	Tiempo medio libre de Síndrome de Bronquiolitis Obliterante calculado	6
<b>Figura 5</b>	Imágenes del TAC de tórax con BOS (a) y RAS (b)	8
<b>Figura 6</b>	Cambios en los parámetros de la función pulmonar en la BOS y en el RAS	9
<b>Figura 7</b>	Imagen histológica de obliteración de la luz endobronquial en paciente con rechazo crónico	10
<b>Figura 8</b>	Esquema de la patogenia de la Bronquiolitis Obliterante	12
<b>Figura 9</b>	Reconocimiento alogénico: Vía directa	13
<b>Figura 10</b>	Reconocimiento alogénico: Vía indirecta	14
<b>Figura 11</b>	Reconocimiento alogénico: Vía semidirecta	15
<b>Figura 12</b>	Perfil de citoquinas liberadas tras la activación del linfocito CD4+ naïve del receptor	16
<b>Figura 13</b>	Respuesta alogénica: el rechazo o tolerancia del injerto	17
<b>Figura 14</b>	Acción directa de la aloreactividad en el desarrollo de la BOS	18
<b>Figura 15</b>	Acción de la aloreactividad potenciada por otros factores sobre el desarrollo de la BOS	18
<b>Figura 16</b>	Rechazo agudo A2	20
<b>Figura 17</b>	Bronquiolitis linfocítica B1R	21
<b>Figura 18</b>	Deposito tisular de C4d	23
<b>Figura 19</b>	Evolución del FEV1 de los pacientes antes y después del rechazo crónico	56

<b>Figura 20</b>	Evolución del FEV1 en función de la pendiente de descenso después del diagnóstico de BOS	58
<b>Figura 21</b>	Evolución de los macrófagos antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	60
<b>Figura 22</b>	Evolución de los neutrófilos antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	60
<b>Figura 23</b>	Evolución de los de linfocitos TCD4 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	61
<b>Figura 24</b>	Evolución de los de linfocitos TCD4 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	62
<b>Figura 25</b>	Valor de IL-8 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	64
<b>Figura 26</b>	Valor de IL-6 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	64
<b>Figura 27</b>	Valor de MCP-1 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	65
<b>Figura 28</b>	Valor de IP-10 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	65
<b>Figura 29</b>	Valor de MIG antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	66
<b>Figura 30</b>	Valor de RANTES antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS	66
<b>Figura 31</b>	Correlación entre los neutrófilos y los macrófagos	68
<b>Figura 32</b>	Correlación entre los subtipos de linfocitos TCD4/CD8 en el rechazo crónico	69
<b>Figura 33</b>	Correlación entre los subtipos de linfocitos T en el rechazo crónico	70
<b>Figura 34</b>	Correlación entre linfocitos CD4CD25 y linfocitos CD4 de memoria (CD45RO) tras el desarrollo del rechazo crónico	72
<b>Figura 35</b>	Correlación entre la IL-8 y los neutrófilos	76
<b>Figura 36</b>	Correlación entre la IL-8 y CD56+CD16-CD3 (Post-BOS)	76
<b>Figura 37</b>	Correlación entre la IL-8 y los linfocitos CD19+	77
<b>Figura 38</b>	Correlación entre la IL-6 y células CD56 (NK)	78
<b>Figura 39</b>	Correlación inversa entre la citoquina MIG y los linfocitos CD3CD4CD25	80

<b>Figura 40</b>	Correlación entre el descenso de la función pulmonar y el porcentaje de linfocitos TCD8 naive (CD45RA) tras el desarrollo del de rechazo crónico	81
<b>Figura 41</b>	Correlación entre caída de la función pulmonar y subtipo de linfocitos TCD8 de memoria (CD45RO)	82
<b>Figura 42</b>	Valor de la IL-6 y el descenso de la función pulmonar	83



---

## ***Introducción***

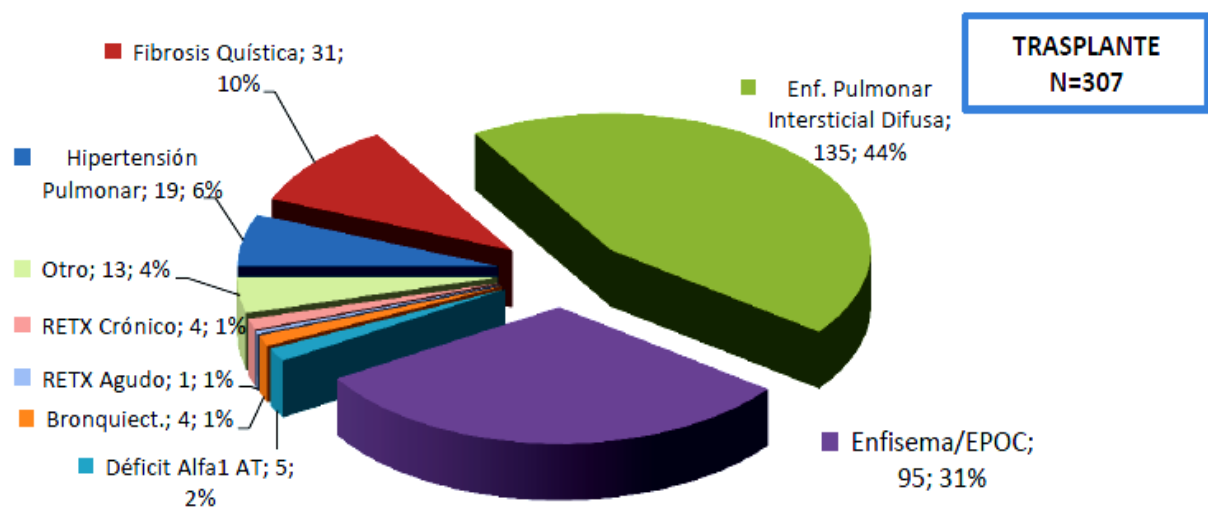
## **1-INTRODUCCIÓN:**

Tras casi 50 años y más de 30.000 procedimientos en todo el mundo, el trasplante pulmonar es una opción terapéutica a considerar en un amplio grupo de pacientes con enfermedad pulmonar en estadio final, en las que puede mejorar la supervivencia y la calidad de vida. Según los datos de la Sociedad Internacional de Trasplante Cardíaco y Pulmonar (ISHLT) se realizan casi 4.000 trasplantes anuales <sup>1</sup>.

En España, se inició la actividad trasplantadora hace más de 20 años, y se han realizado desde entonces 4.088 procedimientos hasta Diciembre del 2016. El número anual de trasplantes se ha visto incrementado progresivamente hasta estabilizarse alrededor de las 275 intervenciones anuales siendo 2016 un año record con 307 procedimientos. Actualmente existen 7 unidades de trasplante pulmonar en España, que realizan alrededor de 40 procedimientos al año <sup>2</sup>. Los centros acreditados son el Hospital Universitario Valle de Hebrón de Barcelona (HUVHB), el Hospital Universitario y politécnico de la Fe de Valencia (HULFV), el Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid (HU120), el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla de Santander (HUMV), el Hospital Reina Sofía de Córdoba, el Complejo Hospitalario A Coruña y el Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda de Madrid (HUPHM).

Las patologías más frecuentes subsidiarias de trasplante pulmonar son la fibrosis pulmonar idiopática, la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la fibrosis quística. La fibrosis pulmonar constituye la principal indicación de trasplante. Según datos de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), durante el año 2016 el 38% de los pacientes en lista de espera y el 44% de los receptores de trasplante presentaban fibrosis pulmonar (Figura 1).

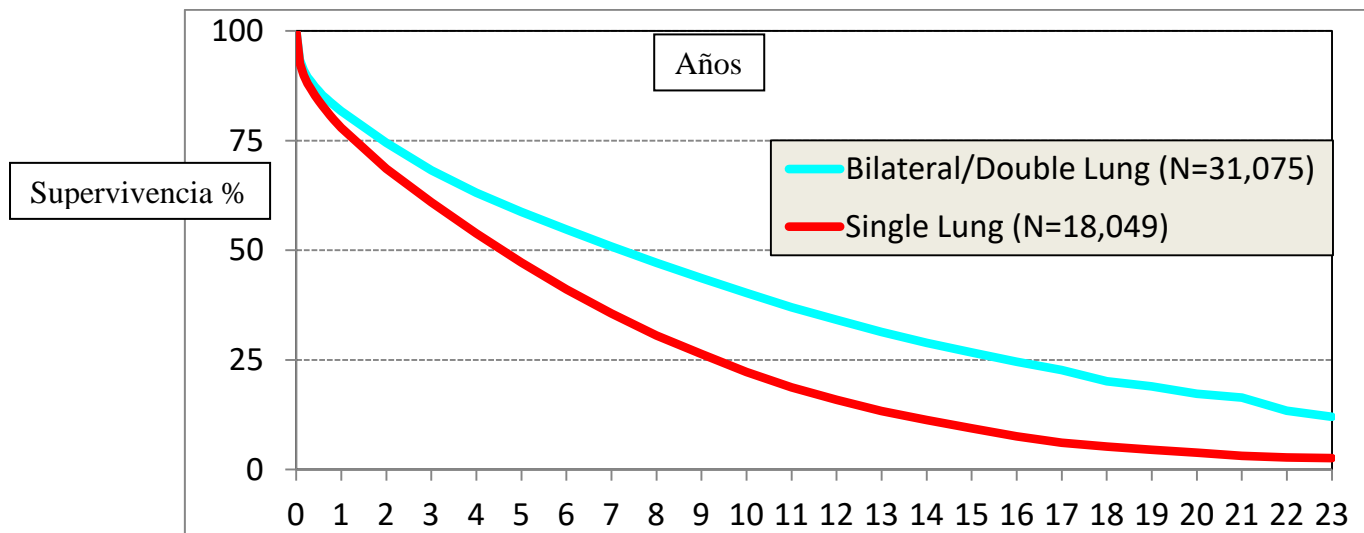
**Figura 1:** Enfermedad de base de los pacientes trasplantados en España durante el año 2016. La principal causa de trasplante fue la enfermedad pulmonar intersticial difusa (44%), seguida de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (31%) y en tercer lugar la fibrosis quística (10%). El resto de indicaciones menos frecuentes son la hipertensión pulmonar (6%), bronquiectasias de causa diferente a la fibrosis quística (1%) o retrasplante (1%) (www.ont.es)



La supervivencia de los receptores de trasplante pulmonar es inferior a la obtenida en otros receptores de trasplante como el cardíaco, el renal o el hepático. Esto es debido a que la supervivencia a largo plazo de los receptores de trasplante pulmonar está condicionada por el frecuente desarrollo de rechazo crónico. Los avances en el manejo perioperatorio y en la inmunosupresión han permitido mejorar la supervivencia a medio y corto plazo, pero han impactado de forma menos importante en la supervivencia a largo plazo (Figura 2). En este sentido y según los datos del registro de la ISHLT, el tiempo medio de supervivencia para el paciente trasplantado bipulmonar fue de 7,3 años y para el trasplante unilateral de 4,6 años <sup>1</sup>. Este hecho se debe, en

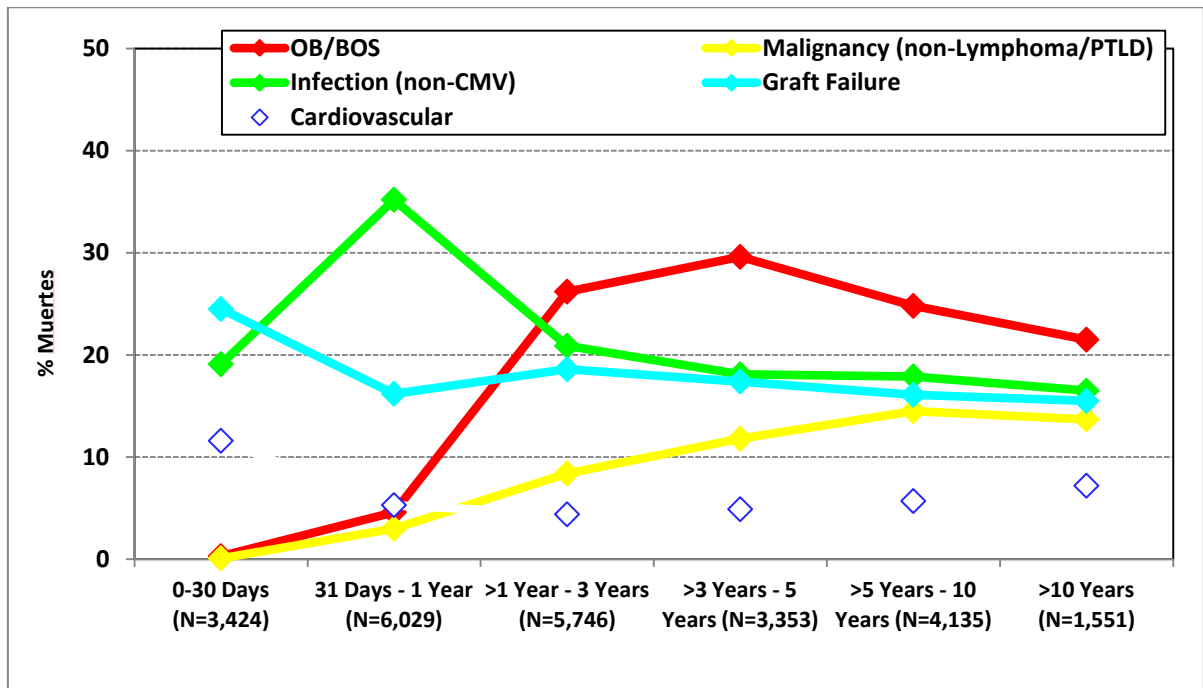
parte, al desarrollo de inmunorreactividad tardía no inhibida con los fármacos inmunosupresores actualmente disponibles.

**Figura 2:** Supervivencia de pacientes adultos con Trasplante pulmonar a nivel internacional, incluidos todos los pacientes de los que hay seguimiento hasta el 2016. Se calculó utilizando el método de Kaplan-Meier. ([www.ISHLT.org](http://www.ISHLT.org))



La manifestación clínico-patológica del rechazo pulmonar crónico es la bronquiolitis obliterante (BO), principal causa de mortalidad del trasplante pulmonar después del primer año, y responsable de alrededor del 30% de los fallecimientos anuales (Figura 3).

**Figura 3:** Causas de mortalidad del Trasplante Pulmonar. Durante el primer año postrasplante la disfunción precoz del injerto y las infecciones son la principal causa de muerte. A partir del primer año la principal causa de mortalidad es el desarrollo de bronquiolitis obliterante (www.ISHLT.org)



Los resultados del trasplante pulmonar pueden optimizarse, si elegimos al receptor apropiado, lo informamos de forma correcta, lo trasplantamos en el momento oportuno y lo cuidamos de forma adecuada antes y después de la intervención. Entre las asignaturas pendientes se encuentra la prevención de la disfunción crónica del injerto, principal causa de la limitada supervivencia a largo plazo de los receptores de trasplante pulmonar.

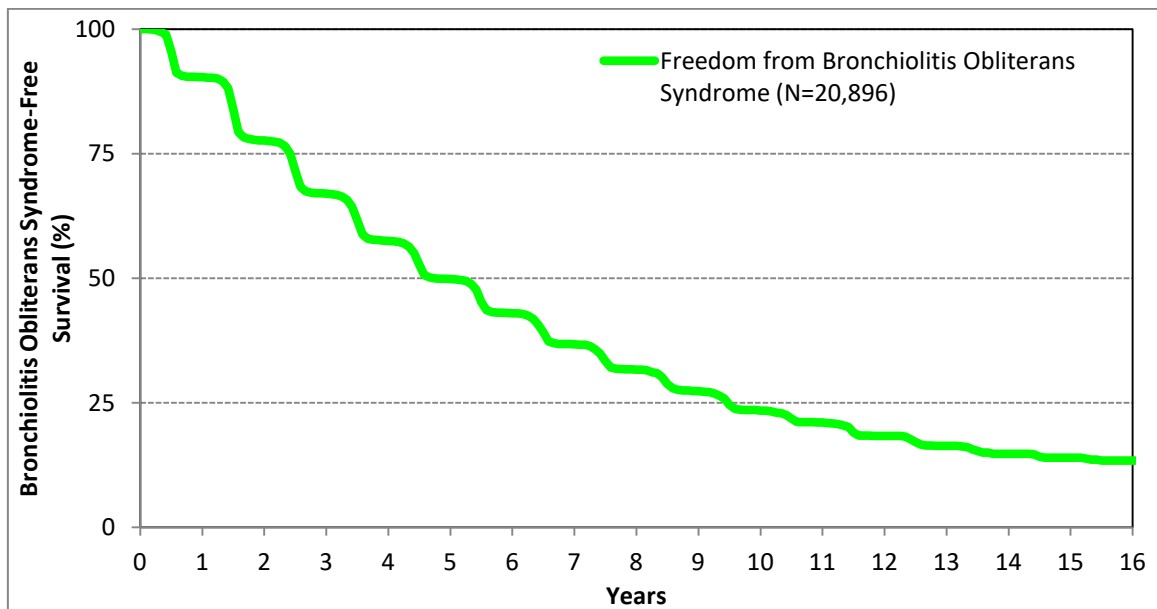
## **2-DISFUNCION CRÓNICA DEL INJERTO**

### **2.1. DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO. SÍNDROME DE BRONQUIOLITIS OBLITERANTE**

El rechazo crónico fue descrito por primera vez, en 1969 por Derom et al. en el primer sobreviviente a largo plazo de un trasplante de pulmón. Histológicamente, el examen post mortem reveló bronquiolitis constrictiva con fibrosis y obliteración de la vía aérea, por lo que el rechazo crónico fue designado como bronquiolitis obliterante (BO). El rechazo crónico del injerto ha sido reconocido desde el inicio del trasplante como un problema importante que dificulta el resultado a largo plazo. Por esta razón, existen múltiples investigaciones y estudios cuyo máximo esfuerzo se centra en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo del rechazo crónico y en su forma de tratarlo, puesto que actualmente sigue siendo una complicación progresiva e incurable.

La probabilidad de desarrollar rechazo crónico aumenta con el tiempo de supervivencia post-trasplante, y afecta al 12% de los receptores al primer año y a más del 50% a los 5 años (Figura 4).

**Figura 4:** Tiempo medio libre de Síndrome de Bronquiolitis Obliterante calculado por el método de Kaplan-Meier ([www.ISHLT.org](http://www.ISHLT.org))



El rechazo crónico, se caracteriza clínicamente por la pérdida persistente de la función del injerto, como se demuestra por una disminución en el flujo espiratorio del primer segundo (FEV<sub>1</sub>). En 1993, se adoptó el término de síndrome de bronquiolitis obliterante (Bronchiolitis Obliterans Syndrome: BOS) para identificar este síndrome de aparición tardía (es decir, después de los tres primeros meses del postoperatorio), que no podía explicarse por otras complicaciones potencialmente reversibles, tales como rechazo agudo, infección o problemas de sutura bronquiales. El BOS se manifiesta por una disminución de al menos un 10% del FEV<sub>1</sub> respecto al valor basal, definido por las dos mejores mediciones consecutivas con un intervalo de 3 semanas o más. La evolución clínico-funcional, una vez establecida la BOS es muy variable. Se han descrito tres patrones diferentes en función de la pendiente de caída del FEV<sub>1</sub>: 1) evolución rápida, con un descenso progresivo e irreversible del FEV<sub>1</sub>; 2) deterioro rápido inicial con posterior estabilización; y 3) deterioro

lento y progresivo. No existe ningún parámetro con fiabilidad suficiente para determinar con exactitud el patrón que seguirá cada paciente diagnosticado de BOS <sup>3</sup>.

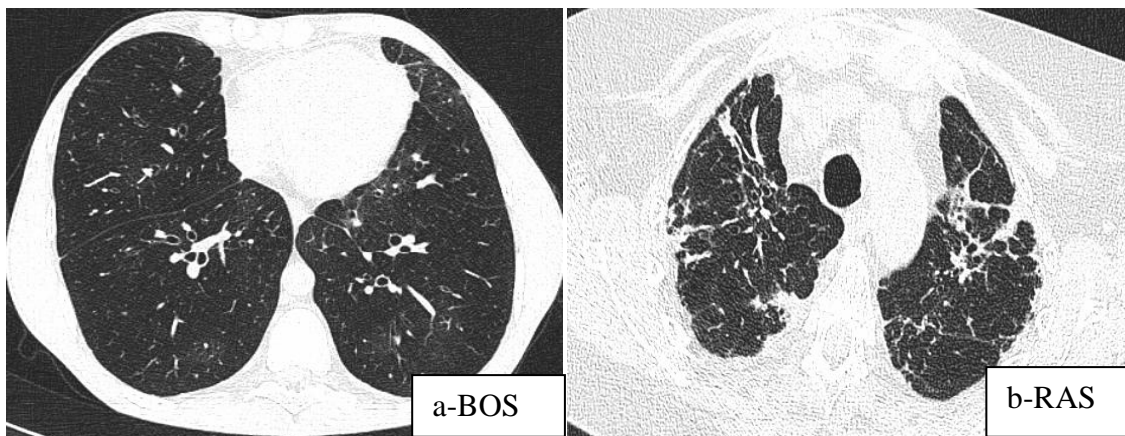
Durante muchos años el BOS fue considerado la única manifestación de la disfunción crónica del injerto pulmonar (Chronic Lung Allograft Dysfunction: CLAD). Los términos “rechazo crónico” y “BOS” eran usados indistintamente. Sin embargo, en 2011 se describió una nueva entidad nosológicamente distinta con el nombre de Síndrome Restrictivo del Injerto (Restrictive Allograft Syndrome: RAS). Desde entonces, el término CLAD ha sido usado para referirse a todas las variantes de disfunción crónica pulmonar, fundamentalmente BOS y RAS. <sup>4</sup> El RAS se define como una caída irreversible en la capacidad pulmonar total (TLC) > 10% respecto al valor basal, acompañado en la radiología de lesiones fibróticas que ocurren en la periferia del pulmón (pleura visceral, intersticio alveolar, septos interlobulares); mientras que en el BOS, se observa un patrón obstructivo secundario a las lesiones fibróticas que fundamentalmente ocurren en los bronquiolos <sup>5</sup> (Figura 5, Figura 6).



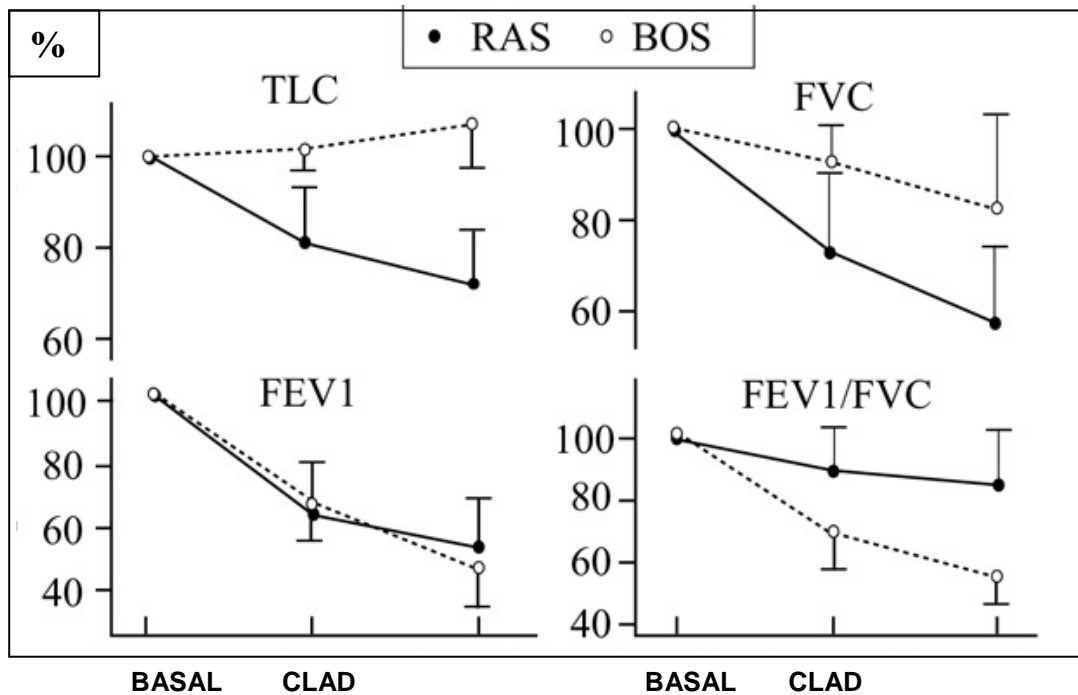
Figura 5:

a-Imagen de TAC de tórax con signos de atrapamiento aéreo en paciente diagnosticado de BOS

b-Imagen de TAC de tórax con engrosamiento de los septos interlobulares en los lóbulos superiores en un paciente diagnosticado de RAS (Imágenes cedidas por servicio de Radiología del Hospital Universitario Puerta de Hierro)

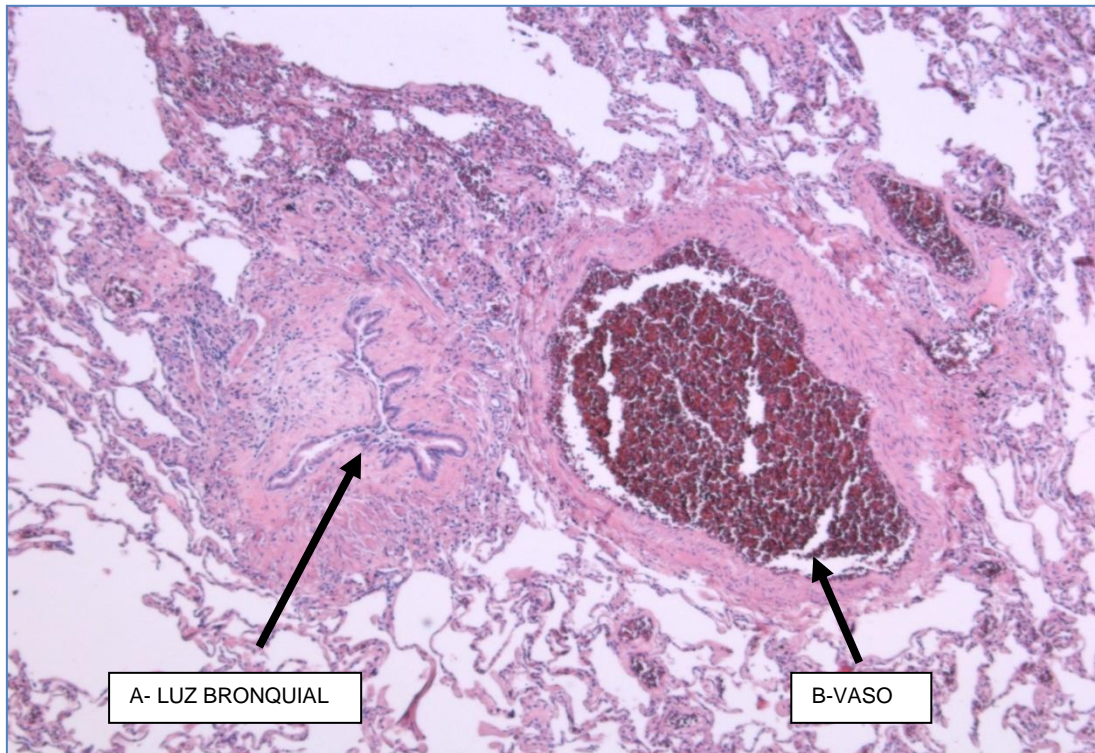


**Figura 6:** Cambios en los parámetros de la función pulmonar en la BOS y en el RAS. Observando fundamentalmente un descenso de la FVC y de la TLC en el patrón restrictivo <sup>4</sup>.



Ambos tipos de lesiones pueden coexistir y en general comparten los mismos factores de riesgo <sup>6</sup>. Esto hace pensar que las dos entidades tienen la misma vía patogénica. La lesión de la célula epitelial secundaria a mecanismos inmunológicos y/o no inmunológicos, desencadena una fase inicial de inflamación linfocítica de la submucosa, seguida de una fase fibroproliferativa con degradación de la matriz extracelular, proliferación de fibroblastos, miofibroblastos, depleción de defensas antioxidantes y depósito aberrante de fibras de colágeno con pérdida de la homeostasis en la regeneración de la matriz extracelular <sup>7</sup>. Se postula que las lesiones fibróticas de la vía aérea son el resultado de la transición de las células epiteliales a células mesenquimales (EMT), mecanismo por el cual, en estadios avanzados se produce la obstrucción endoluminal (Figura 7).

Figura 7: Imagen histológica de obliteración de la luz endobronquial en paciente con rechazo crónico comparada con la luz vascular, A- luz bronquial; B-vaso (cortesía de la Dra. Salas)



Actualmente no existe ninguna terapia eficaz para la CLAD, por lo que, el único tratamiento posible es su prevención primaria y su detección precoz, cuando aún no se ha establecido la fibrosis. Definir mejor los factores de riesgo y los marcadores implicados en la patogénesis de la misma nos puede ayudar a prevenir su desarrollo y mejorar los resultados del trasplante a largo plazo.

## 2.2. CLAD MECANISMOS ETIOPATOGÉNICOS

El pulmón está expuesto continuamente al sistema inmune circulante a través del gasto cardiaco y a agentes infecciosos y a otros antígenos inhalados, por ello, está dotado de un amplio sistema inmune que le permite responder frente a distintas agresiones.

El tejido linfoide del epitelio bronquial puede activarse a través de diversos mecanismos aloinmunes y no aloinmunes, que condicionan la activación de los linfocitos T <sup>8</sup> (Figura 8). Los mecanismos etiopatogénicos y los factores de riesgo implicados en el desarrollo de la CLAD se detallan en la tabla 1 <sup>9-11</sup>.

**Tabla 1:** Clasificación de los factores de riesgo implicados en el desarrollo de la disfunción crónica del injerto, según su mecanismo etiopatogénico (Referencia 7).

**Mecanismos aloinmunes**

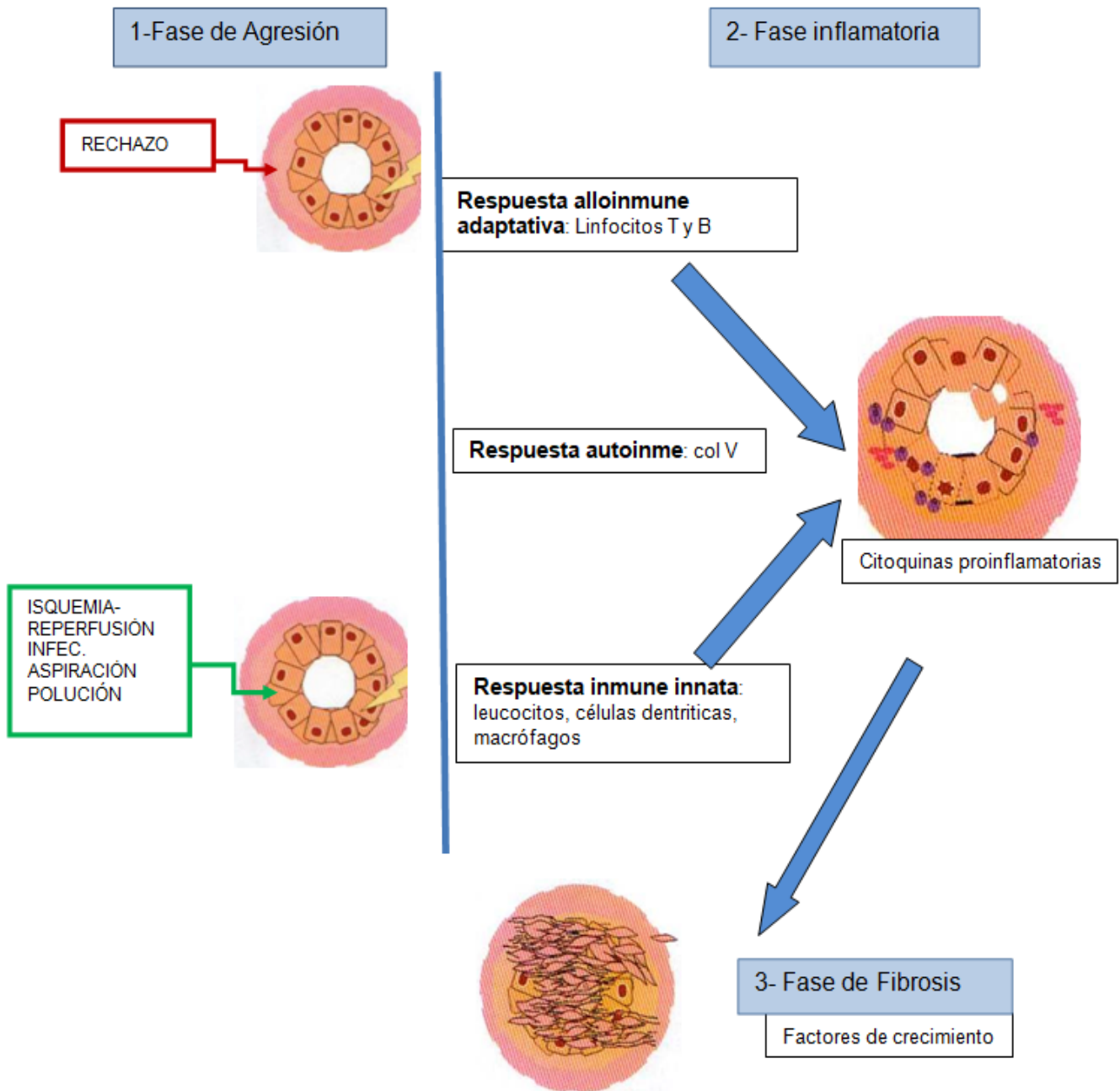
Rechazo celular agudo  
Bronquiolitis linfocítica  
Rechazo mediado por anticuerpos

**Mecanismos no aloinmunes**

Disfunción primaria del injerto  
Infección respiratoria (CMV, bacterias, Aspergillus)  
Reflujo gastroesfágico (RGE)  
Polución

**Figura 8:** Esquema de la patogenia de la Bronquiolitis Obliterante

- 1-Lesión primaria del epitelio de la vía respiratoria por varios agentes, cuando la agresión es persistente activa diferentes respuestas inmunes
- 2-Respuesta inflamatoria a la lesión con liberación de citoquinas
- 3-Respuesta de reparación con proliferación de fibroblastos y depósito de matriz extracelular

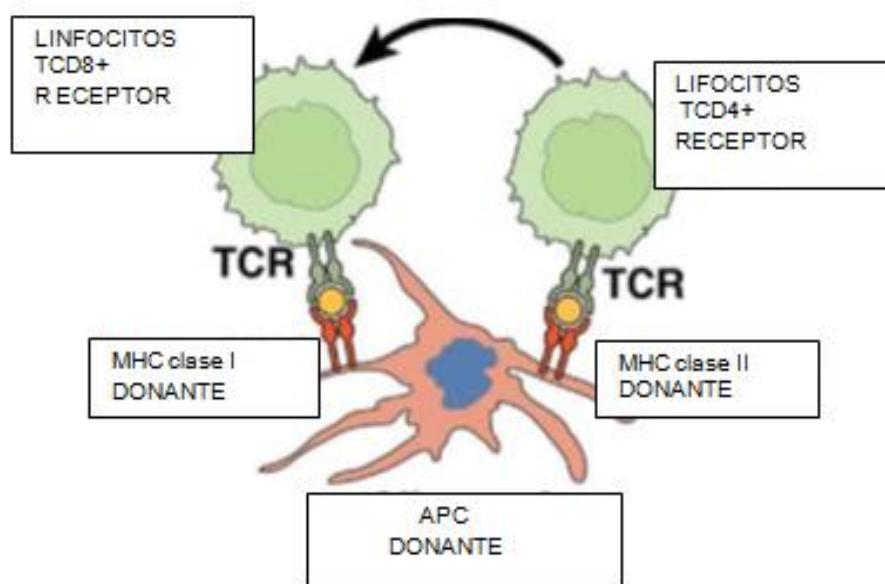


### 2.2.1 Respuesta Aloinmune

La respuesta inmune adaptativa se inicia con el reconocimiento de los antígenos del donante. El sistema inmunitario del receptor se enfrenta a células con moléculas HLA distintas de las suyas y por tanto susceptibles de ser reconocidas como extrañas. Las células presentadoras de antígenos (APC), principalmente macrófagos y células dendríticas, procesan los antígenos del donante. Este reconocimiento puede realizarse por tres vías diferentes <sup>12</sup>.

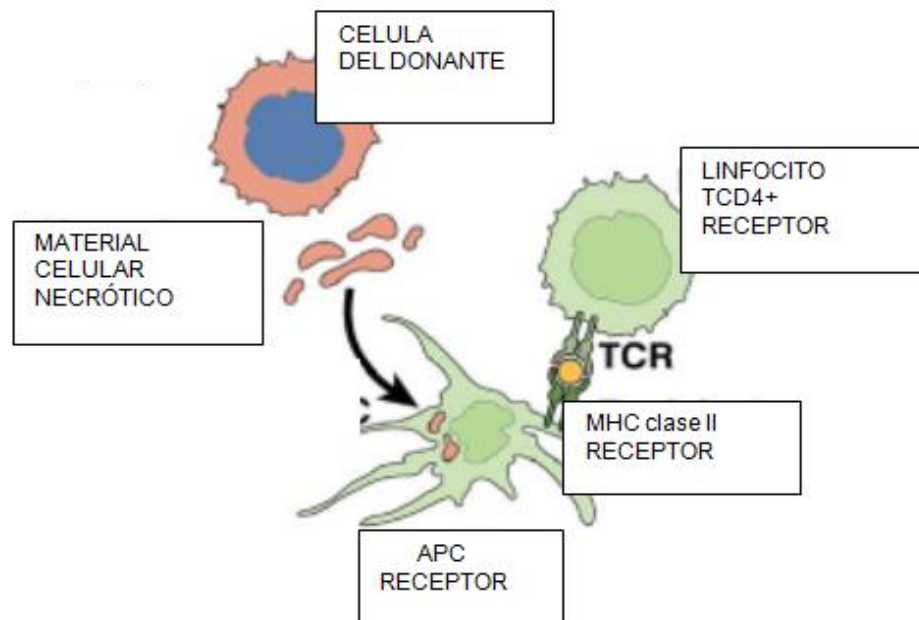
**-Vía directa:** Las células T del receptor reconocen las moléculas MHC alogénicas intactas en la superficie de las células presentadoras de antígeno (APC) del donante, mediante el llamado reconocimiento directo, sin precisar procesamiento del antígeno. En estas circunstancias, el número de linfocitos T CD4 y CD8 que reconocen a un aloantígeno es muy alto, debido al cruce entre el receptor del linfocito T (TCR) y la molécula HLA extraña (Figura 9).

**Figura 9:** Reconocimiento alogénico: Vía directa (Referencia 10)



**-Vía indirecta:** Las moléculas HLA del donante son procesadas por las APC del receptor, las fraccionan en péptidos y las presentan como extraños a los linfocitos T del receptor, en el seno del HLA propio, es lo que se llama reconocimiento indirecto (Figura 10).

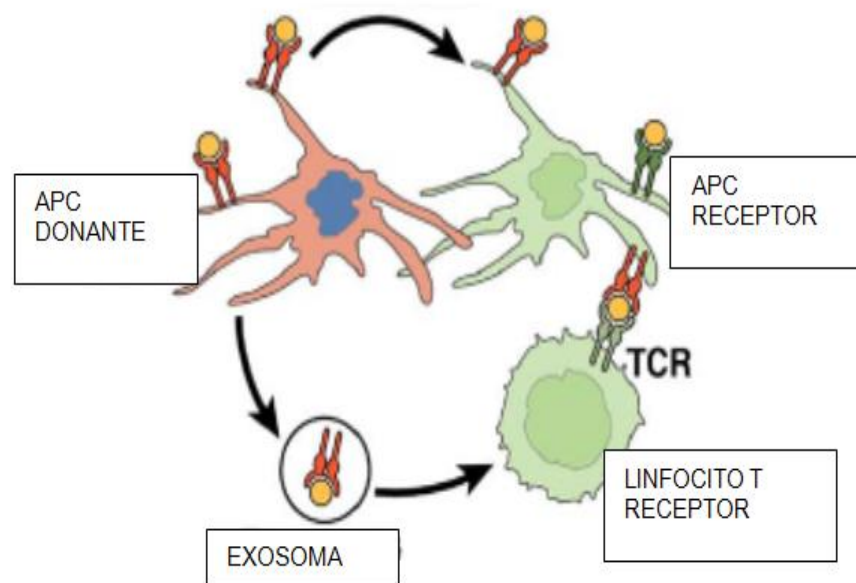
**Figura 10:** Reconocimiento allogénico: Vía indirecta (Referencia 10)





**-Reconocimiento semidirecto:** Un último mecanismo se produce por la activación del linfocito T del receptor a través de la vía directa e indirecta. En el reconocimiento semidirecto las moléculas HLA del donante son presentadas a las células del receptor sin procesamiento previo. La célula presentadora de antígeno (APC) del receptor adquiere directamente las moléculas intactas del HLA del donante y/o a través de la fusión de exosomas procedentes de las células del donante en los linfocitos del receptor (Figura 11).

**Figura 11:** Reconocimiento allogénico: Vía Semidirecta (Referencia 10)



El reconocimiento del antígeno por cualquiera de estas vías desencadena la activación de los linfocitos T naive, capaces de generar diferente respuesta celular inmune, destructiva (Th1, Th2, Th17) o inmunorreguladora (Treg) en función de las citoquinas liberadas (Figura 12).



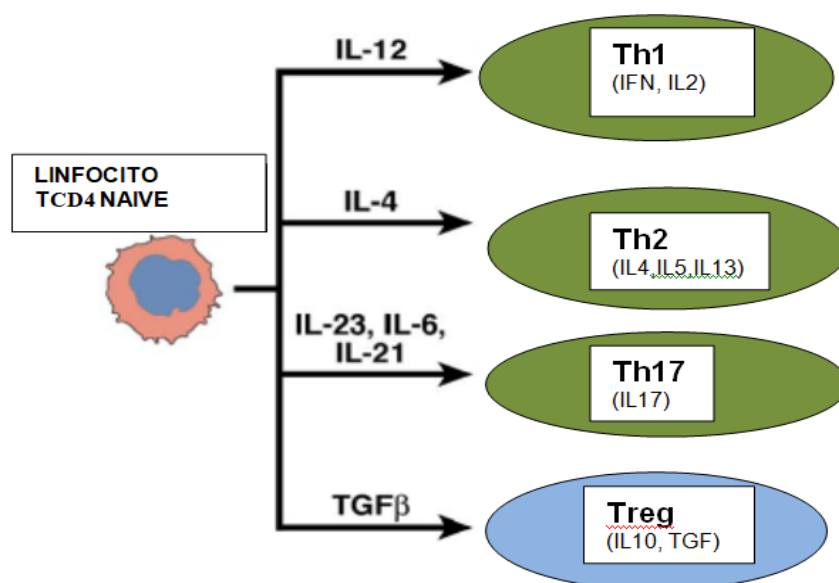
**-Respuesta inmune tipo Th1:** Los Linfocitos T colaboradores secretan mayoritariamente IL-2, IL-12 e IFN-gamma. Son los primeros en activarse en la respuesta alogénica, facilitan la expansión clonal y la respuesta inflamatoria. Este tipo de respuesta está principalmente asociada a la inmunidad celular.

**-Respuesta inmune tipo Th2:** Los Linfocitos T colaboradores secretan mayoritariamente IL-4, IL-5, IL-13. Son de activación más tardía. Colaboran con la producción de Inmunoglobulinas.

**-Respuesta inmune tipo Th17:** es identificada por la producción de IL-17, IL-23 y está asociada con la autoinmunidad.

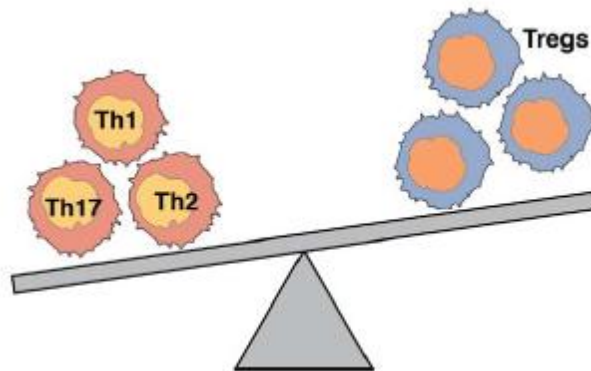
**-Respuesta de células T reguladoras (Treg):** induce la secreción de IL-10. Es capaz de suprimir otras células T y favorece el desarrollo de tolerancia.

**Figura 12:** La activación del Linfocito CD4+ naive del receptor desencadena la respuesta linfocítica de fenotipo destructivo o protector del injerto en función del perfil de citoquinas liberadas (Referencia 10).



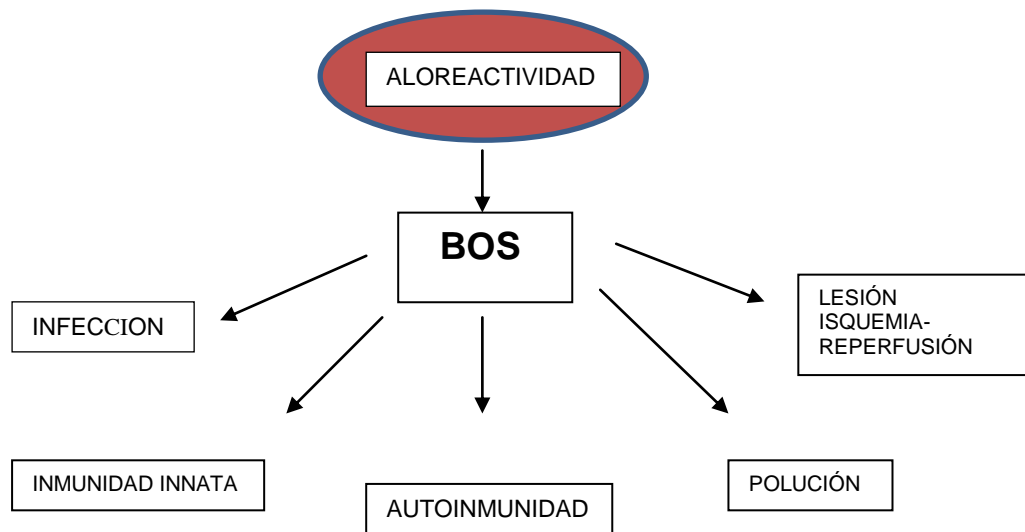
El éxito en la prevención de la CLAD depende posiblemente de la modulación de los tres tipos de respuesta inmune y del balance entre las células T efectoras y las inmunomoduladoras (Figura 13):

**Figura 13:** Respuesta allogénica: el rechazo o tolerancia del injerto depende del balance entre las células T efectoras y las células T inmunomoduladoras (Referencia 10).

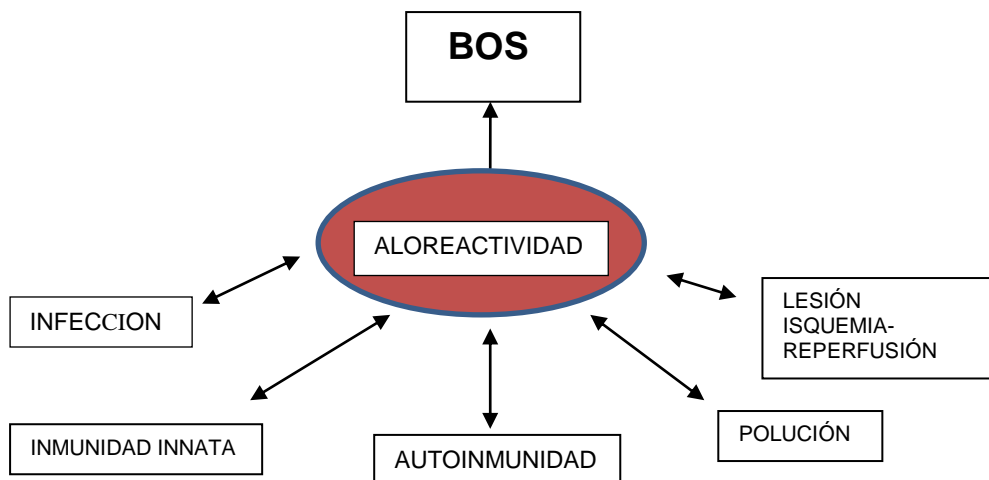


La potencia de la respuesta aloimmune es determinada por la disparidad antigénica entre donante y receptor y por la interacción de otros factores no allogénicos, que potencian la aloreactividad (Figura 14, 15).

**Figura 14:** Acción directa de la aloreactividad en el desarrollo de la BOS (Referencia 7)



**Figura 15:** Acción de la aloreactividad potenciada por otros factores sobre el desarrollo de la BOS (Referencia 7)



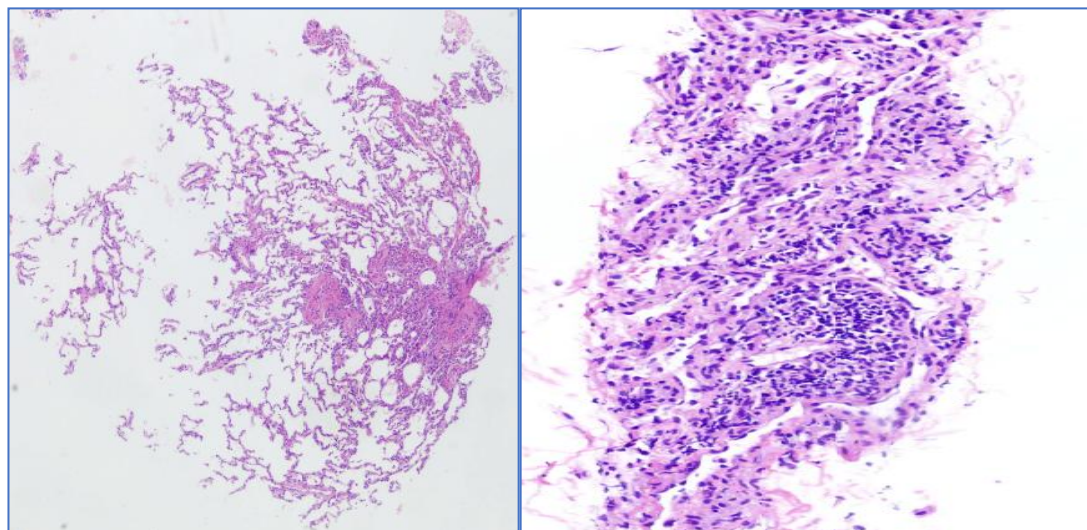
Los factores de riesgo aloinmunes implicados en el desarrollo del rechazo crónico son el rechazo agudo, la bronquiolitis linfocítica y el rechazo mediado por anticuerpos (Tabla 1)

**-Rechazo Agudo (RA):** El RA se produce tras la respuesta de las células T del receptor frente a los antígenos alogénicos expresados en el injerto. El reconocimiento de estos aloantígenos pone en marcha la liberación de IL-1 y de IL-2 con la consiguiente activación y proliferación de células CD4 y CD8.

Las lesiones histológicas del rechazo agudo se caracterizan por un infiltrado linfocitario perivascular, que puede extenderse al intersticio y al espacio alveolar (Figura 16). La gravedad del rechazo se cuantifica entre A1 leve y A4 severo en función de la intensidad y la extensión perivascular e intersticial del infiltrado linfocitario (Tabla 2) <sup>13</sup>. El infiltrado celular predominantemente es de linfocitos T, aunque en las fases iniciales se pueden observar polimorfonucleares y eosinófilos y en las fases más evolucionadas con destrucción celular macrófagos y monocitos. La incidencia del RA varía entre un 40-75%, y aparece fundamentalmente durante los primeros meses postrasplante. El RA de aparición tardía es de peor pronóstico, posiblemente porque obedece a mecanismos inmunológicos distintos, pero también porque su diagnóstico y tratamiento se suelen retrasar.

Las lesiones que aparecen durante el RA son potencialmente reversibles, pero en ocasiones se mantienen y determinan una forma de rechazo que puede evolucionar hacia el rechazo crónico. Numerosos estudios han identificado al RA como el factor de riesgo más importante de la CLAD, incrementando el riesgo los episodios repetidos de RA, el mayor grado de severidad y su aparición tardía <sup>14</sup>.

Figura 16: Rechazo Agudo A2: Infiltrados mononucleares perivasculares, subendotelio (cortesía de la Dra. Salas)

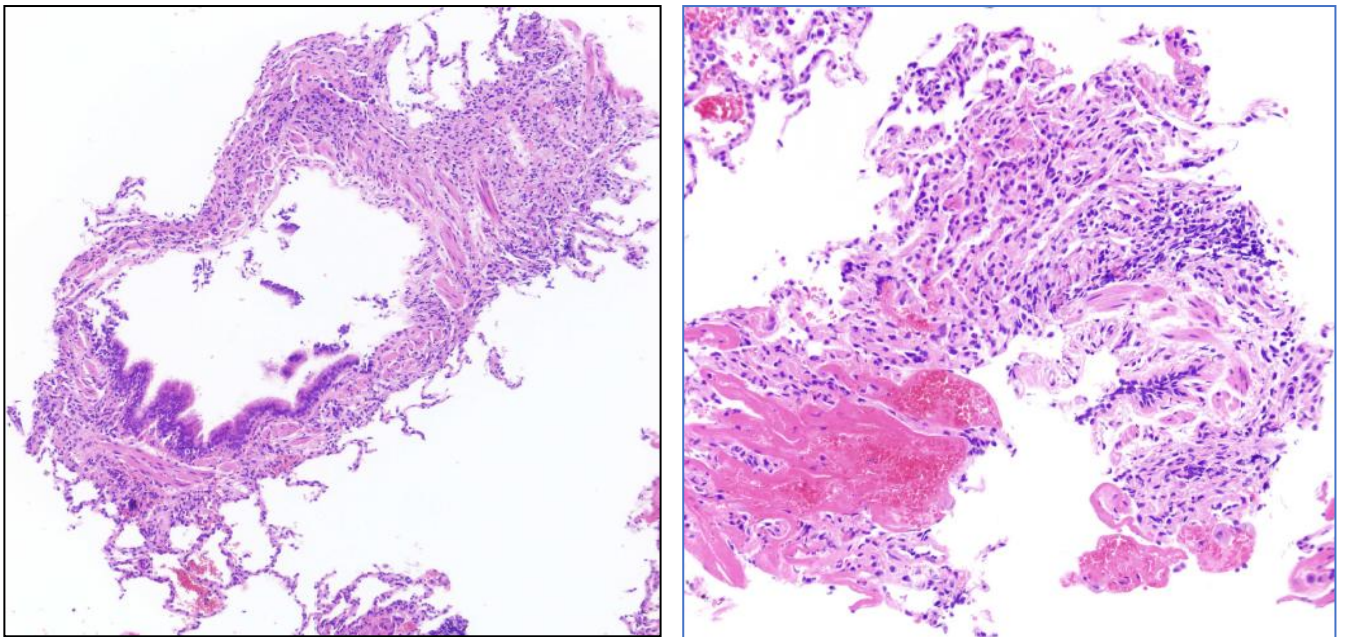


**Tabla 2:** Grados de severidad del rechazo celular agudo según la extensión del infiltrado linfocitario perivascular (Referencia 12)

Categoría del rechazo	Grado	Severidad	Histología
GRADO A: Rechazo Agudo	0	Ninguna	Sin anomalía evidente
	1	Mínimo	Discreto infiltrado perivascular mononuclear
	2	Leve	Más frecuente infiltrado perivascular, puede haber eosinófilos
	3	Moderado	Infiltrado perivascular denso, extensión al espacio intersticial, puede tener eosinófilos y neutrófilos
	4	Severo	Infiltrado difuso perivascular, intersticial y en el espacio aéreo. Neutrófilos pueden estar presentes

- **Bronquiolitis linfocítica:** Se caracteriza por el infiltrado intraepitelial de linfocitos activados (Figura 17). Es considerada como un importante factor de riesgo de desarrollo de bronquiolitis obliterante. En la última clasificación del rechazo se considera como una condición del RA que le confiere severidad (Tabla 3) <sup>13-15</sup>.

Figura 17: Bronquiolitis linfocítica B1R: Infiltrado intraepitelial de los linfocitos (cortesía de la Dra. Salas)



**Tabla 3:** Grados de severidad de la afectación de la vía aérea, bronquiolitis linfocítica (Referencia 12)

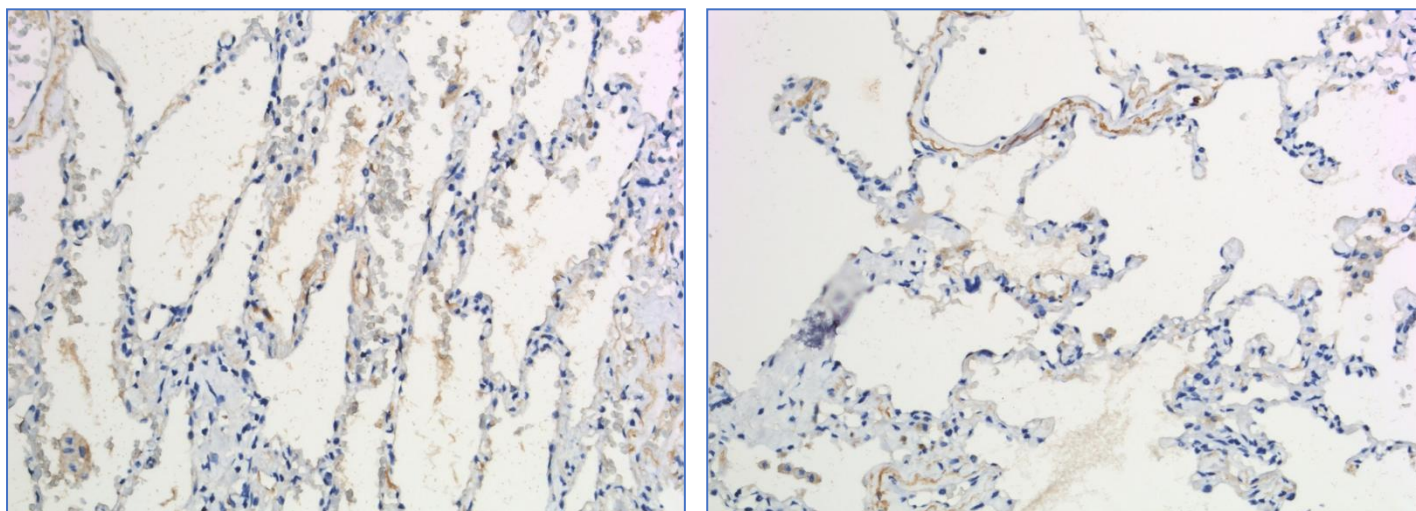
Categoría del rechazo	Grado	Severidad	Histología
GRADO B: Afectación vía aérea	0	Ninguna	No evidente inflamación bronquiolar
	1R	Bajo	Infrecuente, capa de células mononucleares en submucosa en submucosa bronquiolar
	2R	Alto	Largo infiltrado de linfocitos activados en la submucosa bronquiolar, puede haber eosinófilos

#### **-Rechazo mediado por anticuerpos:**

Las células T activadas tras el reconocimiento antigénico, estimulan la diferenciación de células B y la producción de anticuerpos. El desarrollo de anticuerpos anti HLA clase I y II después de la cirugía, se ha asociado con el incremento de riesgo CLAD y empeora la supervivencia del receptor. La detección de Ac donante específico (DSA) es un marcador indirecto de reconocimiento alogénico, ha sido asociada con rechazo agudo y crónico y mortalidad. Sin embargo, es controvertido atribuir directamente al DSA la lesión anatomopatológica específica del injerto pulmonar, por lo que para el diagnóstico de rechazo mediado por anticuerpos se requiere, además, evidencia de disfunción del injerto con o sin depósito tisular de C4d (Figura 18, Tabla 4). Los factores asociados al desarrollo de DSA “de novo” son entre otros, la lesión del injerto por isquemia-reperfusión y el rechazo celular agudo<sup>16,17</sup>.



Figura 18: Deposito tisular de C4d (cortesía de la Dra. Salas)



**Tabla 4:** Criterios diagnósticos del rechazo mediado por anticuerpos (AMR)  
(Referencia 14)

	Criterios
RECHAZO HUMORAL	Detección de Ac anti HLA u otro anticuerpo donante específico (DSA)
	Evidencia de depósito C4d en el injerto.
	Disfunción del injerto
	Descripción patológica compatible en el tejido



### 2.2.2 Respuesta Inmune Innata

Otros mecanismos etiopatogénicos implicados en la activación del linfocito son los generados por mecanismos inmunes no alogénicos, mediados fundamentalmente por la respuesta inmune innata.

Las células epiteliales de la vía aérea (AEC) junto con los macrófagos, neutrófilos, células NK, y células dendríticas (CD)<sup>18</sup> son la primera línea de defensa frente a patógenos. Estas células son componentes principales del sistema inmunitario innato y son capaces de reconocer patógenos asociados a patrones moleculares, a través, de la expresión de un amplio rango de receptores de reconocimiento (PRR). Entre ellos, se encuentra la familia de los receptores “toll like” (TLR), 13 componentes encargados del reconocimiento de patógenos. En humanos, los polimorfismos más conocidos son TLR2, TLR4 y TLR9 asociados al reconocimiento de virus y bacterias y a la probabilidad de desarrollar CLAD<sup>19,20</sup>.

La activación del sistema inmunitario innato, se caracteriza por dar respuestas inespecíficas y rápidas. Los macrófagos y las células dendríticas, tras reconocer y unirse a los patógenos, pueden fagocitarlos y eliminarlos. Dependiendo del tipo de patógeno y del contexto en el que se encuentren estas células, promueven una respuesta efectora (Th1, Th2, Th17) dirigida a la eliminación del patógeno, participando en la iniciación y polarización de la respuesta inmune adaptativa, que confiere inmunidad específica y con memoria<sup>21</sup>.

La respuesta inmune innata ha sido relacionada con el desarrollo de rechazo crónico a través de la disfunción crónica del injerto, las infecciones, la aspiración por reflujo gastroesofágico y la polución.

#### **-Disfunción primaria del injerto (DPI):**

La DPI se define por la presencia de edema pulmonar no cardiogénico, en las primeras 72 horas del trasplante. La reperfusión del pulmón, tras un periodo de isquemia, genera la activación celular, fundamentalmente neutrofílica, con liberación de radicales libres de oxígeno y de enzimas proteolíticas. Asimismo, aumenta la permeabilidad microvascular pulmonar por lesión de la célula endotelial y se inicia la respuesta inflamatoria con activación de monocitos y

macrófagos, liberación de citoquinas proinflamatorias TNF, IL1, IL6, IL8 y otros mediadores como el factor activador de plaquetas <sup>22</sup>. En la clínica se manifiesta como hipoxemia severa progresiva, deterioro de la ventilación con hipercapnia e hipertensión pulmonar. La prevalencia de la DPI oscila entre un 15,4-22,1%. El desarrollo de disfunción precoz del injerto y su grado de severidad ha sido asociada con peor supervivencia a largo plazo, atribuible al incremento del riesgo de CLAD <sup>23</sup>.

**-Infección respiratoria:**

Diversos patógenos han sido relacionadas con el desarrollo de CLAD, pero la mayor evidencia de esta asociación es con la infección por *Citomegalovirus* (CMV). La infección por CMV produce un incremento en la expresión de HLA I y II en las células epiteliales, sobrerregulación de citoquinas proinflamatorias y por tanto de la respuesta allogénica. Hay estudios que demuestran que la profilaxis frente al CMV además de disminuir el riesgo de infección por CMV, reduce el riesgo de CLAD <sup>24-27</sup>.

Los receptores de trasplante pulmonar, especialmente por fibrosis quística, desarrollan con frecuencia colonización de la vía aérea inferior por *Pseudomona Aeruginosa* <sup>28-31</sup> y *Aspergillus* <sup>32,33</sup>. Ambas han sido relacionadas con mayor frecuencia y severidad de la CLAD.

**-Reflujo gastroesofágico (RGE):** Los pacientes con enfermedad pulmonar avanzada presentan con frecuencia RGE, que se puede agravar tras la intervención con consecuencias nocivas para el injerto <sup>34</sup>. El RGE se exacerba como consecuencia de la denervación pulmonar post-quirúrgica, la abolición del reflejo tusígeno, la alteración del aclaramiento mucociliar y el retraso en el vaciado gástrico. La detección de ácidos biliares y pepsina en el BAL sugiere aspiración y pueden ser un marcador de riesgo del desarrollo de CLAD <sup>35,36</sup>. El mecanismo que une el RGE y la CLAD es desconocido, aunque parece iniciarse con el daño de la célula epitelial como consecuencia de la aspiración<sup>37</sup>.

**-Polución:** Recientemente la contaminación del aire ambiental a largo plazo y la exposición al tráfico se han asociado con la CLAD y la supervivencia

postrasplante <sup>38–40</sup> . Los mecanismos implicados en dicha asociación son desconocidos.

### **2.2.3 Respuesta autoinmune**

La aparición de procesos autoinmunes dirigidos frente a proteínas específicas del epitelio bronquial ha sido asociada con el desarrollo del rechazo crónico. Wilkes et al <sup>41</sup> describieron dos fases en el desarrollo de la CLAD: la primera como consecuencia del daño tisular y la segunda secundaria a fenómenos de autoinmunidad. La lesión tisular secundaria a daño inmune o no-inmune expone antígenos “crípticos” propios, normalmente ocultos, que actúan como gatillo para la proliferación de células T y la producción de autoanticuerpos. Entre las proteínas implicadas cabe destacar el colágeno tipo V (Col V), que reside en la membrana basal del tejido perivascular y peribronquiolar. En modelo experimental murino se ha observado que la exposición del Col (V) desencadena la proliferación de las células T específicas frente al mismo con secreción de citoquinas y respuesta Th1 <sup>42</sup>.

Wilkes y colegas <sup>41</sup> monitorizaron prospectivamente la respuesta frente a Col (V) en receptores de trasplante pulmonar durante un periodo de 7 años. Los resultados fueron notables con 5 o 10 veces aumento del riesgo de CLAD en pacientes con elevada inmunidad mediada por células T Col (V) específica. Otros investigadores han asociado la activación de células Th17 en esta respuesta <sup>43</sup>.

La tubulina es una proteína componente del citoesqueleto celular. La presencia de anticuerpos frente a la tubulina K1 ha sido asociada a procesos de autoinmunidad y destrucción de la célula epitelial. La circulación de anticuerpos anti-K1 tubulina puede inducir factores de crecimiento profibróticos desde las células epiteliales dando lugar a fibrosis <sup>44–46</sup>.

## **2.3. ANÁLISIS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR (BAL): CÉLULAS Y CITOQUINAS**

La lesión de la célula desencadenada por mecanismos aloinmunes o no aloinmunes, solos o en combinación, y su ulterior reparación implican un delicado balance entre citoquinas pro y anti-inflamatorias. Las alteraciones en este balance, pueden influir en el remodelado de la vía aérea, aunque el

mecanismo específico que nos lleva a la lesión obliterante que ocurre en la CLAD no se conoce con exactitud.

El análisis de los diferentes componentes del lavado broncoalveolar (BAL), como método para el diagnóstico y detección precoz de rechazo, ha supuesto el trabajo de numerosos grupos de investigación. El examen de la composición celular y de las citoquinas y proteínas del BAL nos ofrece una ventana al microambiente del injerto pulmonar, y nos puede sugerir los mecanismos fisiopatológicos (inflamatorios, del estrés oxidativo, angiogénesis, remodelado de la matriz, fibrosis y reflujo) que contribuyen al desarrollo y progresión de la CLAD <sup>47</sup>.

El daño epitelial favorece la secreción de citoquinas producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados. Otras células implicadas en su producción como respuesta a las agresiones aloinmunes y no aloinmunes son los leucocitos polimorfonucleares (PMN), las células endoteliales y epiteliales. Como respuesta a la agresión de la célula epitelial se produce acúmulo de leucocitos peribronquiales y marcada liberación de neutrófilos en la luz de la vía aérea. Las células inflamatorias reclutadas producen citoquinas y amplían el reclutamiento celular, y/o actúan junto con factores de crecimiento en el desarrollo de la respuesta fibroproliferativa en la vía aérea distal (Tabla 5) <sup>48,49</sup>

**Tabla 5:** Descripción de las principales células y citoquinas implicadas en el desarrollo de bronquiolitis obliterante (Referencia 46)

Composición celular	Neutrófilos
	Linfocitos ?
	Células NK ?
Citoquinas	IL-8
	IL-6
	MCP-1
	RANTES
	IP-10
	MIG
	IFN $\delta$
	TNF

### 2.3.1. Composición celular

Los **neutrófilos** son las células observadas con mayor frecuencia en el BAL de los pacientes con CLAD. Diversos estudios han demostrado aumento de neutrófilos en el BAL, esputo y biopsias bronquiales y transbronquiales de receptores que desarrollan CLAD <sup>50-52</sup>. Se ha correlacionado el porcentaje de neutrófilos en el BAL con el incremento en el estadio de BOS <sup>19,48,53</sup>. Además, el porcentaje de neutrófilos >20% en BAL de receptores estables ha sido identificada como un marcador predictivo para el desarrollo de CLAD <sup>54-56</sup>. Estos datos sugieren que los neutrófilos tienen un papel principal en el desarrollo y la progresión de la CLAD <sup>57</sup>. Recientemente, se ha propuesto que el porcentaje de neutrófilos >15% en el BAL puede ser usada para definir un nuevo fenotipo de disfunción crónica del injerto, que responde favorablemente al tratamiento con azitromicina, denominada disfunción del injerto neutrofílica reversible <sup>58,59</sup>.

Varios estudios han examinado las **subpoblaciones de linfocitos** y su implicación en el desarrollo de la CLAD. Los linfocitos T helper (CD4+) son cruciales en la iniciación y en la coordinación de la respuesta al rechazo, basado en su perfil de secreción de citoquinas darán lugar a células T ayudantes de tipo 1 (Th1), de tipo 2 (Th2) y del tipo Th17. Sin embargo, no está completamente claro el papel de las células T citotóxicas (CD8+), especialmente en la fase crónica <sup>57</sup>. Diferentes trabajos han descrito un descenso persistente en el porcentaje de linfocitos TCD4+ y aumento de los linfocitos T CD8+, en trasplantados estables y en receptores con BOS; siendo más evidentes los cambios en el último grupo <sup>60</sup>. El aumento en la relación CD8/CD4 en las células del BAL puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de rechazo crónico a largo plazo <sup>61</sup>. Existen estudios que sugieren incluso, que estas variables pueden ser útiles en la monitorización de la efectividad de la terapia inmunosupresora <sup>62,63</sup>.

Las células T reguladoras (linfocitos Treg) abarcan una amplia diversidad de poblaciones inmunorreguladoras que se caracterizan por mecanismos de acción específicos. Las células FOXP3+CD4+T-reguladoras (Treg) tienen un papel protector con posibilidad de control de la respuesta inmune y de reducir la inflamación local. La presencia de células Treg en el injerto pulmonar o en la sangre se ha correlacionado con la ausencia de disfunción crónica. Más específicamente, el balance celular Th17/Treg podría determinar el destino del injerto pulmonar. Un porcentaje de Treg < 3.2% puede predecir el desarrollo de CLAD en los dos primeros años postrasplante <sup>64</sup>.

Los linfocitos CD 56+ (células NK) <sup>65</sup> juegan un papel significativo en la defensa del organismo frente a diversos agentes infecciosos. Durante mucho tiempo se las consideró implicadas principalmente en la inmunidad innata, pero hoy en día se sabe que también juegan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa y cada vez más se les está adjudicando una función inmunorreguladora <sup>66-68</sup>. En realidad, las células NK no son una población homogénea. En sangre periférica, las células NK humanas pueden subdividirse en diferentes subpoblaciones basadas en la expresión diferencial en superficie de los marcadores CD16 (receptor de baja afinidad de la fracción Fc de la inmunoglobulina G) y CD56 (molécula mediadora de la adhesión homotípica). Las dos subpoblaciones principales son:

- las células CD56dim/CD16+. Representan al menos el 90% de las NK circulantes en sangre periférica, fenotípicamente se caracterizan por la expresión de receptores inhibidores de muerte (KIR) y receptores de citotoxicidad (NCR). Su función fundamental es su gran actividad citotóxica, caracterizada por su contenido de perforina, granzymas y gránulos citolíticos. Además, la intensidad con que expresan CD16 las convierte en eficientes mediadores de citotoxicidad celular mediada por anticuerpos <sup>69</sup>.
- las células CD56bright/CD16dim-. Son un máximo de 10% de las NK circulantes, pero constituyen la mayoría de las células NK en los tejidos linfoides secundarios. Fenotípicamente se caracterizan por la ausencia de expresión de KIR y una expresión moderada de NCR. Presentan una actividad citotóxica muy débil, pero más eficientes en la producción de citoquinas; principalmente IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , G-MCSF, IL-10 e IL-13 <sup>65</sup>.

Diferentes estudios han analizado otros componentes celulares del BAL en la CLAD como los **macrófagos** que junto con las células dendríticas son las principales células presentadoras de antígenos (APC). Existen datos que sugieren que los macrófagos juegan un papel en el desarrollo de la CLAD, al observar una estabilización en la evolución de la disfunción del injerto tras el bloqueo de su infiltración. La asociación entre el aumento de **eosinófilos** y disfunción del injerto se ha descrito, debido, a su capacidad de liberar por un lado marcadores del estrés oxidativo que favorecen la destrucción del injerto y por otro, al factor de crecimiento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) dando lugar a un remodelado aberrante de la vía aérea. El aumento de eosinófilos en el BAL se ha correlacionado con el fenotipo restrictivo de la CLAD.

### 2.3.2 Citoquinas

Las citoquinas son proteínas cuya función en el organismo es coordinar la respuesta del sistema inmunológico y lo hacen reclutando o inhibiendo las funciones de células específicas, como los neutrófilos y regulando la proliferación y la diferenciación celular.

El remodelado de la vía aérea depende del balance entre citoquinas pro- y anti-inflamatorias. El patrón de citoquinas liberado dicta si la respuesta inmune es del tipo 1, 2 o 17. Aunque los tres tipos de respuesta pueden coexistir en el

rechazo del injerto <sup>48,49,70,71</sup>. Las principales **citoquinas** relacionadas con el rechazo crónico son <sup>72</sup>:

- **IL-8**, citoquina pro-inflamatoria liberada principalmente por macrófagos alveolares y células epiteliales. Encargada del reclutamiento y la activación de neutrófilos después del trasplante. Es la citoquina que con mayor frecuencia se ha asociado con el desarrollo de CLAD <sup>73,74</sup>. Incluso, varios estudios han mostrado que su elevación en el BAL, puede preceder hasta en un año al diagnóstico clínico del BOS <sup>75</sup>.
- **IL-17**, citoquina liberada en la respuesta inmune tipo Th17. Es un potente quimiotáctico indirecto de neutrófilos, a través de la inducción de la secreción de IL-8 desde diferentes tipos de células de la vía aérea. La activación de la cadena IL-17/IL-8 se ha observado tras mecanismos de lesión celular aloinmune o autoinmune, en presencia de colonización bacteriana de la vía aérea y en el RGE <sup>43</sup>.
- **Interferón gamma (IFN gamma)**, citoquina liberada por la respuesta inmune tipo Th1, es el principal activador de macrófagos, células T citotóxicas y NK. En un estudio realizado en 23 pacientes trasplantados se observó que el aumento en la expresión de IFN  $\gamma$  en el BAL se correlacionaba con el deterioro del FEV1 y mayor riesgo de CLAD <sup>76-78</sup>.
- **IL-6**, citoquina proinflamatoria, liberada por la respuesta inmune tipo Th2. Ha sido asociada con rechazo agudo refractario y con el BOS. Magman y colaboradores <sup>79</sup> demostraron una producción aumentada de IL-6 y TNF por los macrófagos alveolares cultivados durante el periodo del rechazo crónico.
- **IL-2**, citoquina liberada por la respuesta inmune tipo Th1, activada en respuesta a estímulos antigénicos. Inicialmente se describió como factor de crecimiento de células T, ya que es el principal agente que controla su proliferación. Actualmente se conoce que es además un factor estimulador del crecimiento de linfocitos B y células NK, y que promueve



la actividad citotóxica mediada por linfocitos T. Tras unirse a su receptor en el linfocitos T, activa la secreción de IFN-alfa, IL-4, IL-3, IL-5 y GM-CSF. Sobre los linfocitos B estimula su crecimiento y diferenciación e incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase II <sup>80</sup>.

- **IL-10**, citoquina asociada a la respuesta inmune tipo Th2, presenta actividad inmunomoduladora, aunque no está claro su función en el rechazo del injerto. Los niveles elevados de la IL-10 en el BAL han sido asociados a buena evolución, por lo que se postula que puede ser un marcador de tolerancia al injerto <sup>81</sup>.
- **MCP-1**, conocida como proteína 1 quimiotáctica de monocitos, atrae linfocitos T de memoria y células dendríticas y puede contribuir a la diferenciación de monocitos en macrófagos fibrogénicos. Los estudios que han determinado MCP-1 en el BAL observan elevación en los pacientes con CLAD, que puede preceder a la detección clínica de la misma <sup>49</sup>.
- **MIG (CXCL9)**, citoquina secretada por diferentes tipos de células estimuladas por el interferón gamma. Principalmente actúa como quimiotáctica de células T activadas <sup>82-84</sup>.
- **IP-10 (CXCL10)**, su producción es inducida por interferón gamma a nivel de células mieloides, células mononucleares, fibroblastos y células endoteliales. Actúa como quimiotáctico para monocitos y linfocitos TCD4+ durante la respuesta inmune inflamatoria y ha sido implicada como un importante mediador del rechazo agudo en receptores de trasplante de órgano sólido <sup>85</sup>. Neujahr y colaboradores <sup>86</sup> asociaron su detección con empeoramiento de la función pulmonar, y que su determinación prospectiva puede identificar pacientes con riesgo de desarrollar BOS <sup>83,84</sup>.
- **RANTES (CCL5)**, regulador sobre la activación normal de las células T que han sido expresadas y secretadas. Conocida como la principal

citoquina quimiotáctica para células T CD4+ de memoria, eosinófilos y monocitos. Monti y colaboradores <sup>87</sup> observaron expresión de RANTES en los macrófagos alveolares y las células epiteliales de la vía aérea durante el rechazo agudo. Reynaud-Gaubert <sup>75</sup> detectó aumento de la expresión de RANTES en fases precoces de BOS.

- **TGF- $\beta$** , citoquina con un papel crucial en la síntesis y mantenimiento de reacciones fibróticas a nivel pulmonar. Actúa como quimiotáctico de macrófagos y fibroblastos, así como en la modulación de la síntesis del colágeno. Potente estimulador de la matriz extracelular. En diferentes estudios se ha observado aumento en la expresión de TGF-B en el BAL de pacientes con CLAD <sup>88</sup>.

## 2.4. JUSTIFICACIÓN

El rechazo crónico produce disfunción progresiva del injerto y afecta a más del 50% de los receptores de trasplante pulmonar a los 5 años de la intervención. No tiene tratamiento eficaz y es la principal causa de mortalidad a largo plazo de dichos pacientes.

La secuencia patogénica de la CLAD es compleja y en gran parte desconocida. Una vez establecida es irreversible y en la mayoría de los casos evolutiva, por tanto, la identificación de precursores del rechazo crónico puede ayudar a realizar estrategias que frenen la progresión de la enfermedad, antes de la degradación del injerto. En este sentido, el lavado broncoalveolar es una técnica diagnóstica que nos permite analizar el perfil celular y bioquímico del espacio alveolar. Diversos estudios han analizado la utilidad del BAL para la predicción y el diagnóstico de la CLAD, pero ninguno de ellos ha demostrado la suficiente evidencia para ser aceptado clínicamente. Por ello, son necesarios más estudios que nos ayuden a conocer mejor la patogénesis de la CLAD e identificar biomarcadores predictores de progresión de la enfermedad y/o de su respuesta al tratamiento.

---

***Hipótesis***

“La composición celular y el perfil de citoquinas en el lavado broncoalveolar es un reflejo del microambiente inflamatorio del parénquima pulmonar y su monitorización puede ser una herramienta útil para el diagnóstico del rechazo crónico y predecir su posterior progresión”

---

## ***Objetivos***

---

**OBJETIVO PRINCIPAL:**

Analizar el perfil de células y citoquinas del BAL en receptores de trasplante pulmonar que desarrollan rechazo crónico del injerto y su asociación con la progresión de la disfunción.

**OBJETIVOS SECUNDARIOS:**

4. Comparar el perfil de células y de citoquinas en muestras del BAL antes y después del desarrollo de rechazo crónico
5. Correlacionar los niveles de citoquinas y el porcentaje de células antes y después del desarrollo de rechazo crónico
6. Correlacionar el deterioro de la función pulmonar con las células y citoquinas en el BAL antes y después del rechazo crónico

---

## ***Material y Métodos***

### **5.1.- POBLACIÓN**

Se incluyeron en el estudio pacientes adultos con rechazo crónico que fueron sometidos a un primer trasplante pulmonar en el Hospital Universitario Puerta de Hierro y que realizaban su seguimiento en nuestra unidad. Los receptores seleccionados cumplían los siguientes criterios:

#### **-Criterios de inclusión:**

-Pacientes diagnosticados de BOS, con disminución de al menos un 10% del FEV1 respecto su valor basal, evaluado en dos mediciones con un intervalo de 3 semanas o más, no justificable por otra causa como rechazo agudo, infección o estenosis de la vía aérea.

#### **-Criterios de exclusión:**

-Pacientes con evidencia de rechazo agudo o infección activa en las bronoscopias seleccionadas para realizar el estudio.

-Pacientes diagnosticados de disfunción crónica del injerto del tipo síndrome del Injerto Restrictivo (RAS).

#### **Definiciones:**

-Rechazo agudo: Infiltrado linfocitario perivascular detectado en la biopsia transbronquial.

-Infección activa: Aislamiento de nuevos patógenos en los cultivos del esputo, BAS o BAL, o aumento del número de colonias de gérmenes ya existentes.

-Síndrome del injerto restrictivo (RAS) se define como CLAD con una irreversible caída en la TLC < 10% respecto al valor basal, acompañado en la radiología de un patrón de fibrosis, de predominio en lóbulos superiores.



**Tratamiento inmunosupresor:** De acuerdo con nuestro protocolo todos los pacientes recibían tratamiento inmunosupresor de mantenimiento con triple terapia (tacrolimus o ciclosporina, micofenolato o azatioprina y esteroides).

Cuando se detectó la BOS, se incrementó la dosis de inmunosupresión y/o el metabolito fue reemplazado por Inhibidores TOR (sirolimus o everolimus).

La selección de los pacientes con rechazo crónico fue determinada por la disponibilidad de BAL para el análisis de los marcadores celulares y bioquímicos.

Se han recogido de la historia clínica protocolizada las variables de los 6 meses previos al desarrollo de la BOS, en el momento de diagnóstico y hasta completar 12 meses de seguimiento posterior.

En la tabla 6 se detallan las principales características clínicas de los pacientes.

Tabla 6: Características clínicas de los pacientes

	Sexo	Fecha de nacimiento	Enfermedad de base	Tipo de Trasplante	Fecha de trasplante	Fecha de diagnostico de BOS
1	H	16/12/1955	Enfisema	Unilateral	05/02/1996	01/07/1996
2	V	28/03/1950	Bronquiectasias	Bilateral	29/03/2004	01/10/2004
3	H	09/07/1969	Fibrosis quística	Bilateral	08/07/2003	01/04/2005
4	V	29/10/1986	Fibrosis quística	Bilateral	19/01/2002	11/10/2005
5	V	13/06/1971	Fibrosis pulmonar	Bilateral	09/04/2003	20/01/2004
6	V	01/03/1947	Enfisema	Bilateral	25/10/2000	01/02/2005
7	V	23/08/1955	Fibrosis pulmonar	Unilateral	12/05/2004	01/07/2005
8	H	24/05/1949	Enfisema	Bilateral	28/12/2000	20/12/2002
9	V	05/10/1970	Enfisema	Bilateral	05/12/2000	01/07/2006
10	V	21/04/1939	Enfisema	Bilateral	08/06/2002	01/02/2004
11	V	31/03/1953	Fibrosis pulmonar	Unilateral	09/08/2002	01/08/2006
12	H	19/02/1948	Fibrosis pulmonar	Unilateral	26/04/2006	01/08/2007
13	V	17/03/1978	Fibrosis quística	Bilateral	15/02/2000	01/05/2004
14	H	12/11/1968	Fibrosis quística	Bilateral	02/11/1996	01/10/2006
15	H	03/10/1943	Fibrosis pulmonar	Unilateral	13/08/2002	03/01/2005
16	H	13/03/2008	Fibrosis quística	Bilateral	08/06/2005	01/01/2008
17	V	17/02/1979	Bronquiectasias	Bilateral	11/01/2002	01/03/2003

## Material y Métodos

18	V	05/04/1990	Fibrosis quística	Bilateral	28/08/2009	01/09/2011
19	V	19/11/1948	Fibrosis pulmonar	Bilateral	24/05/2008	01/01/2014
20	H	14/02/1943	Fibrosis pulmonar	Unilateral	23/04/2009	01/06/2013
21	H	27/05/1982	Fibrosis quística	Bilateral	08/09/2001	01/07/2011
22	H	13/01/1969	Linfangioleiomiomatosis	Bilateral	17/09/2010	20/10/2012
23	H	17/07/1949	Enfisema	Bilateral	07/01/2010	30/12/2012
24	V	04/06/1974	Fibrosis quística	Bilateral	21/02/2006	20/08/2013
25	V	04/07/1948	Fibrosis pulmonar	Unilateral	16/05/2006	01/01/2012
26	V	02/10/1954	Enfisema	Unilateral	02/02/2011	01/05/2014
27	V	13/05/1966	Hipertensión pulmonar Primaria	Cardio- pulmonar	01/05/2006	01/05/2010

## **5.2.-PROTOCOLO DE ESTUDIO**

### **5.2.1. Diseño del estudio**

El proyecto se plantea como un estudio descriptivo y observacional, que selecciona retrospectivamente los receptores de trasplante pulmonar que han desarrollado BOS. Una vez seleccionados los pacientes se seleccionaba la fibrobroncoscopia (FBS) realizada antes de desarrollar BOS y una segunda FBS tras el diagnóstico de la misma. Una vez descartado rechazo agudo por la biopsia transbronquial e infección por los cultivos del lavado broncoalveolar y el aspirado bronquial, se procede al análisis de la composición celular y citoquinas en el BAL.

El periodo de estudio incluye a los pacientes trasplantados de pulmón en Hospital Puerta de Hierro desde el inicio del programa en 1995 hasta Diciembre del 2015.

### **5.2.2. Plan de trabajo**

- Recogida de datos mediante hoja protocolizada en la historia de pacientes que han desarrollado rechazo crónico.
- Determinar en el laboratorio de Medicina Interna del Hospital Puerta de Hierro los diferentes componentes a estudio para su posterior análisis.

## **5.3.-MATERIAL:**

### **5.3.1. Pruebas de función pulmonar.**

La determinación de las curvas flujo-volumen a través de la espirometría fueron realizadas en nuestro laboratorio de función pulmonar, de acuerdo con la Normativa SEPAR del año 2013<sup>89</sup>. Se realizaron al alta del trasplante, al mes, 2º, 4º, 6º mes pos-trasplante y posteriormente cada 3 meses.

A los pacientes se les suministraba un espirómetro domiciliario (Vitalograph, copd-6<sup>TM</sup>) y eran instruidos para realizar determinaciones domiciliarias de su función pulmonar.

La espirometría era repetida en nuestro laboratorio siempre que el paciente presentaba descenso de los valores de su espirómetro domiciliario o ante el desarrollo de síntomas como disnea y/o tos.

La selección de los valores de FEV1 para el estudio se describen en la tabla 7 y fueron:

- FEV1 basal
- En el momento del diagnóstico de BOS
- Seguimiento previo al diagnóstico de BOS, a los 3 y 6 meses
- Seguimiento posterior al diagnóstico de BOS, a los 3, 6 y 12 meses

Tabla 7: Seguimiento del FEV1 antes y después del desarrollo del rechazo crónico de los pacientes sometidos a estudio

Paciente	FEV1 basal	FEV1 preBOS (6 meses)	FEV1 preBOS (3 meses)	BOS	FEV1 posBOS (3 meses)	FEV1 posBOS ( 6meses)	FEV1 posBOS (12 meses)
1	2350	2280	2380	2040	1970	2090	1980
2	2650	2690	2590	1500	860	680	
3	3530	3500	3300	3000	2080	1130	1140
4	1650	1610	1440	1480	1340	1380	1240
5	2820	2500	2300	2270	2200	2260	2200
6	3450	3529	3400	3180	3120	2830	2690
7	3290	3280	3190	1800	780	640	
8	3550	3300		2100		1350	1070
9	3335	2900	2840	2560	2580	2510	2410
10	2680	2730	2710	2380	2470	2150	2010
11	2750	2200	1950	1830	1760	1700	1730
12	1800	1550	1440	1230	940	810	
13	2100	2260	2070	1680	1550	1400	1380
14	2650	2660	2770	1790	1290	920	
15	2850	2800	2810	2230	1940	2000	2130
16	2370	2340	2400	1900	1830	1810	
17	2375	2300	2070	1860	1800	1810	1750
18	1700	1400	1300	1120	820	950	680
19	1950	1560	1520	1230	1320	1200	1000
20	1450	1310	1130	1020	880	830	1000
21	2390	2390		1850	1760	1790	1730
22	3250	3310	3130	2000	1960	1630	1220
23	2875	2820	2930	2050	2070	1780	1940
24	3050	2950	2970	2010	1990	2080	2160
25	2700	2610	1780	1710	1730	1730	1900
26	3410	3370	3360	2110	1950	900	500
27	1410	1400	1270	860	670	690	900

Según lo acordado por ISHLT en 1993 la gravedad de la BOS se pondera en función de la disminución del FEV1 respecto al basal. El grado I de BOS con cifras de FEV1 entre 66-80% del basal; Grado 2: con un FEV1 entre el 51-65% del basal; Grado 3: FEV1 entre 0 y 50% del basal. Existen nuevos criterios que han sido creados para la detección precoz de la disfunción del injerto, incluye estadio BOS potencial: definida por descenso del 10-19% en el FEV1.

Se determinó la pendiente de caída del FEV1 en tres momentos del seguimiento:

- 1- Desde el FEV1 basal al FEV1 del diagnóstico del BOS
- 2- Desde el FEV1 basal a los 6 meses después del desarrollo del rechazo crónico.
- 3- Desde el momento del diagnóstico del rechazo crónico al FEV1 de 6 meses de seguimiento posterior.

Para el cálculo se utilizó la fórmula matemática:

% caída del FEV1:

$$[(\text{FEV1 (previo)} - \text{FEV1 (posterior)}) / \text{FEV1 (previo)}] \times 100$$

Se definió paciente estable al que la pendiente del descenso del FEV1 tras el desarrollo del rechazo crónico era  $< 20\%$ .

### **5.3.2. Broncoscopia**

El protocolo de seguimiento en nuestro centro incluye una broncoscopia protocolizada previa al alta postrasplante. Posteriormente se realizan siempre que el paciente presenta síntomas respiratorios y/o disminución del FEV1  $\geq 10\%$ .

Las broncoscopias se realizan en el servicio de Neumología del Hospital Universitario Puerta de Hierro siguiendo los criterios de la "Clinical guidelines and indications for bronchoalveolar lavage" de la European Society of

Pneumology<sup>90</sup>. Se utiliza un fibroscopio flexible de diámetro 20D. Después de la inspección de la tráquea y del árbol bronquial, se realizó el lavado broncoalveolar tras la instilación de 150 ml de solución salina isotónica (tres alícuotas de 50 ml) a temperatura ambiente, desechando los primeros 20 ml del BAL, que serán procesados según los criterios del Centro para cultivos microbiología y análisis citológico. De la mezcla de las tres alícuotas se toman 10 ml que se centrifugan durante diez minutos a 1,500rpm/min, conservando el sobrenadante en 5-6 tubos Eppendorf de propileno de 500 µL que se mantendrán congelados a -80°C hasta la determinación de citoquinas. La muestra se centrifuga para el análisis de las células mononucleadas (CM).

En cada broncoscopia se cogen los siguientes datos:

- Análisis macroscópico de la vía aérea: existencia o no de secreciones.
- Análisis citológico: recuento de células por ml y fórmula
- Análisis microbiológico: cultivos bacterianos con recuento de colonias, cultivos fúngicos, y cultivos víricos, shell-vial para CMV, ziehl y cultivo de Lowenstein y plata metanamina.
- Análisis histológico: estudio en el servicio de anatomía-patológica de la muestra obtenida por biopsia transbronquial para establecer fundamentalmente la presencia o no de rechazo agudo y/o datos de infección.

Para el estudio fue analizado de cada paciente el BAL que había previo al diagnóstico de BOS y posterior a su desarrollo. En la tabla 8 se muestran las fechas de las broncoscopias seleccionadas en relación con el diagnóstico de rechazo crónico.



Tabla 8: Fecha del BAL registrado antes y después del diagnóstico de rechazo crónico

Fecha de broncoscopia antes de BOS	Fecha de diagnóstico de BOS	Fecha de broncoscopia después de BOS
27/02/1996	01/07/1996	27/07/1996
31/05/2004	01/10/2004	29/11/2004
30/05/2004	01/04/2005	26/04/2005
05/04/2004	11/10/2005	10/11/2005
10/06/2003	20/01/2004	20/05/2004
11/06/2003	01/02/2005	08/06/2005
10/06/2004	01/07/2005	21/07/2005
09/12/2002	20/12/2002	03/06/2003
05/02/2004	01/07/2006	13/12/2006
29/01/2003	01/02/2004	06/10/2005
18/10/2002	01/08/2006	28/08/2006
15/06/2006	01/08/2007	07/09/2007
31/10/2002	01/05/2004	30/12/2005
01/12/2005	01/10/2006	05/10/2006
04/12/2002	03/01/2005	21/01/2005
01/07/2005	01/01/2008	01/02/2008
20/01/2003	01/03/2003	15/12/2004
18/12/2009	01/09/2011	29/09/2011
09/08/2010	01/01/2014	27/01/2014
03/04/2013	01/06/2013	12/06/2013
24/06/2011	01/07/2011	12/09/2011
01/10/2012	20/10/2012	24/09/2013
12/12/2011	30/12/2012	13/08/2013
08/01/2013	20/08/2013	19/06/2013
16/06/2011	01/01/2012	20/03/2012
24/03/2014	01/05/2014	16/06/2014
22/02/2010	01/05/2010	12/03/2014

## 5.4.- MÉTODO

### Técnica de laboratorio

#### **5.4.1. Análisis de las poblaciones celulares en el BAL:**

A fin de conocer las poblaciones leucocitarias en el LBA, se incubaron  $1.5 \times 10^5$  células, a 4° C y en oscuridad durante 30 minutos, con una combinación de anticuerpos monoclonales (MoAbs) conjugados con diferentes fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y proteína clorofila peridina (PerCP) y aloficocianina (APC), dirigidos frente a distintos antígenos de superficie: CD45, CD14, CD15, HLA-DR, CD19, CD16, CD56, CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RO, CD45RA. Paralelamente, se usaron como controles de tinción negativos anticuerpos inespecíficos de ratón conjugados con los fluorocromos, del mismo isotipo que los MoAbs utilizados para el análisis de las poblaciones celulares (Tabla 9).

Tras la incubación de las células con su correspondiente combinación de anticuerpos, se efectuó un lavado con PBS para eliminar el exceso de anticuerpos no unidos a las células. La adquisición y análisis de los datos se realizó en un citómetro de flujo FACS calibur con los programas informáticos "CELLQuest" y "Paint-a-gate Pro" (BD Biosciences, San José, CA).

**Tabla 9:** Análisis de la poblaciones celulares por citometría de flujo

Especificidad <sup>(1)</sup>	Clon <sup>(2)</sup>	Células donde se expresan <sup>(3)</sup>
IgG1	X40	No presente en células humanas
CD3	SK7	Linfocitos T (LT)
CD4	SK3	LT cooperadores
CD8	SK1	LT citotóxicos
CD14	MNP9	Monocitos
CD15	MCS-1	Neutrófilos
CD16	NKP15	Células NK
CD19	SJ25C1	Linfocitos B
CD25	2A3	Linfocitos activados
CD45	2D1	Leucocitos
CD45RA	L48	Linfocitos vírgenes
CD45RO	UHCL-1	Linfocitos de memoria
CD56	NCAM16.2	Células NK
HLA-DR	TU36	LT activados, LB

(1) Proteína de superficie reconocida por los anticuerpos monoclonales utilizados.

(2) Clon del que proceden los anticuerpos monoclonales.

(3) Sólo se indican las especificidades mayoritarias.

#### **5.4.2. Medida de las citoquinas en el BAL:**

Estudio de la expresión de factores solubles en el lavado broncoalveolar:

Tras la descongelación de las muestras se determinaron en BAL las concentraciones de factores solubles implicados en procesos inflamatorios:

- Citoquinas inflamatorias como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-2, IL-6, IL-8 y antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10.
- Quimiocinas como la proteína atrayente de monocitos (MCP-1), RANTES, MIG/CXCL9 y IP-10/CXCL10.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la técnica de enzoinmunoensayo (ELISA) siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems). En la placa que contiene fijado anticuerpo de alta afinidad específico de cada proteína se incubaron en paralelo ocho concentraciones conocidas de la proteína y una muestra de suero de cada una de las pacientes, durante el tiempo indicado. Posteriormente se lavó y se incubó de nuevo con un anticuerpo específico conjugado con peroxidasa. Tras un nuevo lavado para eliminar el exceso de anticuerpo se añadió el sustrato, dando lugar a un producto coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de cada una de las proteínas presentes en la muestra. La densidad óptica (DO) se determinó a una longitud de onda de 450nm. Se realizó una recta patrón enfrentando la DO óptica con la concentración de las muestras de las que se conocía la cantidad de proteína y se calculó la concentración en los BAL de los pacientes extrapolando las DO correspondientes

### **5.5.-VARIABLES ANALIZADAS**

El proyecto ha sido diseñado para analizar las siguientes variables:

#### **1-Cualitativas:**

- Sexo
- Enfermedad de base que motivo el trasplante
- Tipo de trasplante
- Fecha de trasplante
- Fecha del diagnóstico de BOS
- Fecha de la broncoscopia previa a la BOS
- Fecha de la broncoscopia posterior a la BOS

#### **2-Cuantitativas:**

- Edad
- FEV1
- Grado de BOS
- Niveles de las citoquinas
- Porcentaje de células

## **5.6.-ESTUDIO ESTADÍSTICO**

Las variables (citoquinas, células) estudiadas no cumplían la asunción de la normalidad por eso no se pudo realizar el análisis por el método T- student.

Los niveles de citoquinas y células antes y después fueron comparadas entre los grupos usando la prueba no paramétrica Test de Wilcoxon, donde se determinaron la mediana (p50), p25, p75, valores mínimos y máximos.

Se analizó la correlación entre citoquinas, células y deterioro de la función pulmonar a través de la correlación de Pearson.

Para comparar niveles entre respondedores y no respondedores, se realizó la prueba U de Mann-Whitney. Para no acumular error tipo I debido a comparaciones múltiples, se realizó un ajuste de Bonferroni, obteniendo un valor de p inferior a 0.003.

Se consideró que había significación estadística cuando el valor de la  $p$  era inferior a 0.05.

### **5.7.- ASPECTOS ÉTICOS. CONSENTIMIENTO INFORMADO**

En las bases de datos no se incluirá información que pueda identificar directa o indirectamente a los participantes en el estudio. Con ello, se respetarán las normas internacionales de protección de datos, así como la legislación española vigente (Ley Orgánica 15/1999 del 13/12/99 de Protección de Datos de Carácter Personal, BOE 298 de 14/12/99). Y se respetará la autonomía del paciente sobre investigación en humanos (Ley 41/2002, de 14 de noviembre, básica reguladora de la autonomía del paciente y de derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica). Los investigadores responsables garantizarán la seguridad de las bases de datos, que no podrán ser utilizadas para otro fin que el señalado en el apartado de objetivos específicos.

Se solicitó la autorización a la comisión de investigación del Hospital Universitario Puerta de Hierro.

---

## ***Resultados***

---



## 6.1-CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Las características demográficas de la población se describen en la tabla 10. La mayor parte de los pacientes habían recibido un trasplante pulmonar bilateral (66%) y se encontraban en un Grado I de BOS (40%). En cuanto a la enfermedad de base que motivó el trasplante no hubo diferencias entre las tres principales patologías la fibrosis pulmonar, la fibrosis quística (29%), y el enfisema (25%).

Tabla 10: Datos demográficos de los pacientes (datos presentados como n (%) o en mediana (p25;p75))

n	27
Sexo, varón n(%)	16 (59%)
Edad (años)	41 (15-66)
Enfermedad de base; n ( %)	
Fibrosis pulmonar	8 (29%)
Fibrosis quística	8 (29%)
Enfisema	7 (25%)
Bronquiectasias	2 (7%)
Linfangioleiomiomatosis	1 (3%)
Hipertensión Pulmonar Primaria	1 (3%)
Tipo de trasplante	
Bilateral	18 (66%)
Unilateral	8 (29%)
Cardiopulmonar	1 (3%)
Tiempo postx BOS (meses)	36 (5 - 120)
Grado de BOS n(%)	
0	5 (18%)
I	12 (44%)
II	10 (37%)
Tiempo de FBS preBOS (meses)	10 (2.3 - 20)
Tiempo de FBS postBOS (meses)	1.5 (0.8 – 5.5)

## 6.2- ANÁLISIS DE LAS PRUEBAS DE FUNCION PULMONAR

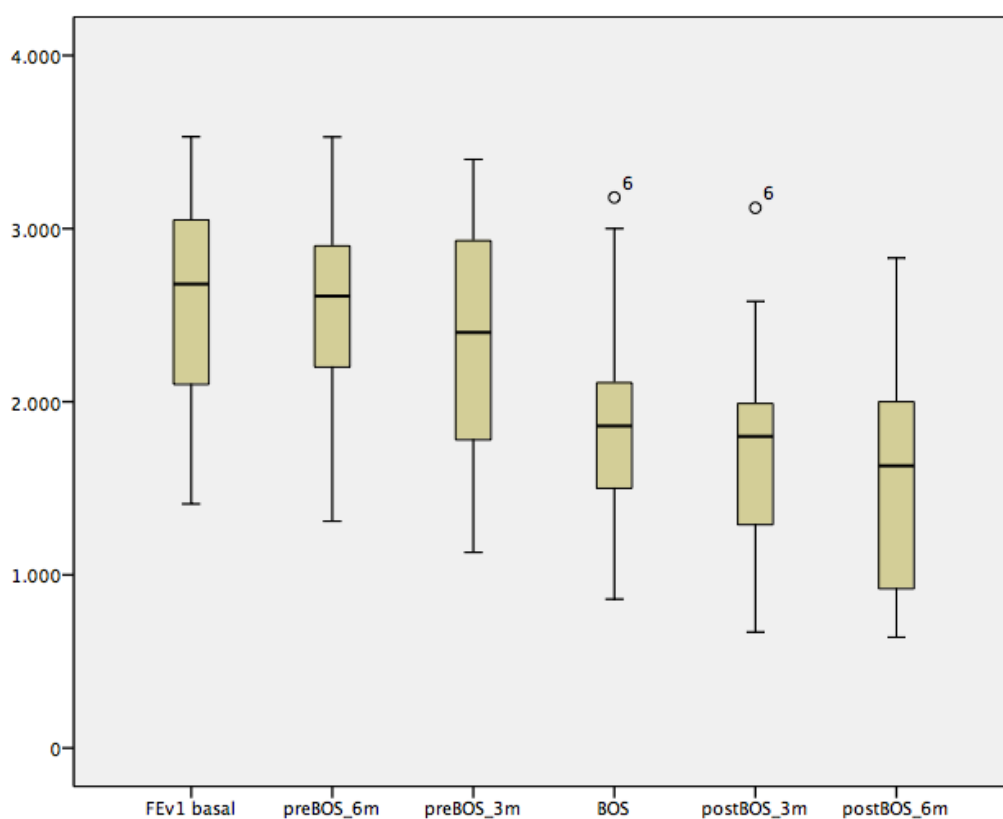
La evolución de la función pulmonar se describe en la tabla 11 (Figura 19).

Se determinó el valor medio del FEV1 en diferentes puntos de seguimiento, el del valor basal, a los 3 y 6 meses previos al diagnóstico de rechazo crónico, al identificar BOS y a los 3 y 6 meses del diagnóstico del mismo crónico

Tabla 11: Valor medio del FEV1 en el seguimiento del paciente

FEV1	Media $\pm$ SD (ml)
Basal	2577 $\pm$ 646
6 meses antes del BOS	2474 $\pm$ 689
3 meses antes del BOS	2362 $\pm$ 725
BOS	1873 $\pm$ 565
3 meses después del BOS	1676 $\pm$ 625
6 meses después del BOS	1516 $\pm$ 623

Figura 19: Evolución del FEV1 de los pacientes antes y después del rechazo crónico



Clasificamos a los pacientes en dos grupos en función del descenso del FEV1 tras el desarrollo del rechazo crónico. Si el porcentaje del descenso del FEV1 fue  $< 20\%$  se llamó el grupo de “estabilización” o si el porcentaje del descenso del FEV1 fue  $> 20\%$  se llamó el grupo de “progresión”. Las características demográficas de ambos grupos se exponen en la tabla 12. No se encontró diferencias significativas en ambos grupos, excepto en el grado de BOS, los pacientes que progresaban presentaban mayor grado. La evolución funcional de ambos grupos se describen en la tabla 13 y Figura 20.

Tabla 12. Características demográficas de los pacientes en función del descenso de la función pulmonar después del desarrollo del rechazo crónico.

LAM: Linfangioleiomiomatosis; HTP: Hipertensión Pulmonar Primaria

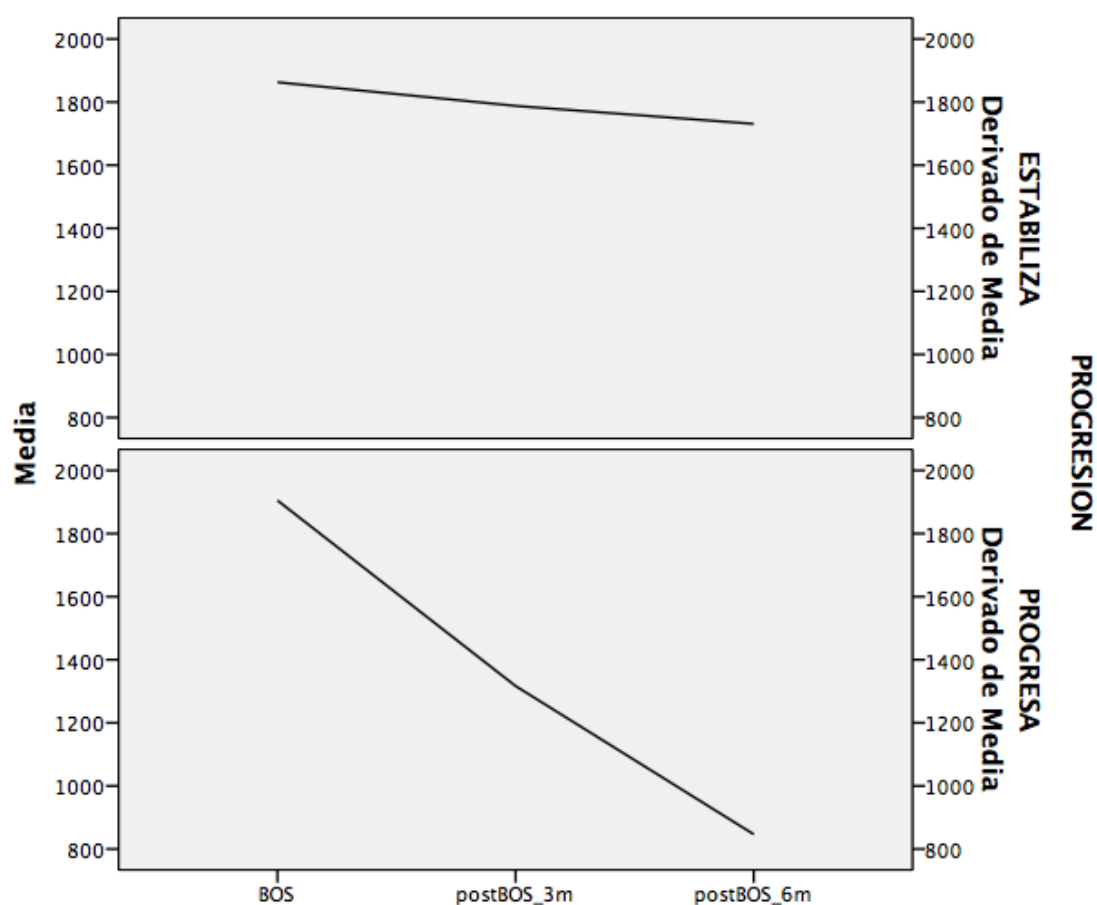
(datos presentados como n (%) o en mediana (p25;p75))  $p^* < 0.05$

	“Estable” ( $< 20\%$ descenso del FEV1)	“Progresión” ( $> 20\%$ descenso del FEV1)	p
n	20	7	
Sexo, varón n(%)	10 (50%)	6 (85%)	0.18
Edad (años)	47 $\pm$ 14	40 $\pm$ 17	0,66
Enfermedad de base; n (%)			0,78
Fibrosis pulmonar	6 (30%)	1 (14%)	
Fibrosis quística	6 (30%)	2 (28%)	
Enfisema	5 (25%)	3 (42%)	
Bronquiectasias, LAM, HTP	3 (15%)	1 (14%)	
Tipo de trasplante			0,44
Bilateral	7 (35%)	1 (14%)	
Unilateral	12 (60%)	6 (85%)	
Cardiopulmonar	1 (5%)	0	
Tiempo postx BOS (meses)	44 $\pm$ 6	34 $\pm$ 11	0,46
Grado de BOS n(%)			0,018*
0	3 (15%)	1 (14%)	
I	10 (50%)	1 (14%)	
II	7 (35%)	2 (28%)	
III	0	3 (42%)	

Tabla 13: Valor medio del FEV1 en función de la pendiente de progresión del FEV1 fuera mayor o menor del 20%

FEV1	“Estable” (<20% descenso del FEV1) (ml) (Media±SD)	“Progresión” (>20% descenso del FEV1) (ml) (Media±SD)
Basal	2479 ± 629	2880 ± 654
6 meses antes del BOS	2358 ± 655	2841 ± 725
3 meses antes del BOS	2231 ± 693	2775 ± 722
BOS	1863 ± 566	1905 ± 613
3 meses después del BOS	1789 ± 611	1316 ± 569
6 meses después del BOS	1725 ± 559	846 ± 179

Figura 20: Evolución del FEV1 en función de la pendiente de descenso tras el diagnóstico de BOS



### 6.3-ANÁLISIS DEL LAVADO BRONCOALVEOLAR

La mediana del tiempo desde la muestra del BAL previa al diagnóstico de BOS fue de 10 meses y desde la fecha del rechazo crónico a la broncoscopia posterior fue 1.5 mes.

En el lavado broncoalveolar obtenido previo y posterior al desarrollo de BOS de cada paciente se determinó la celularidad (Macrófagos, neutrófilos, linfocitos, CD4, CD8, Células NK (CD56), CD25, CD19) y las citoquinas inflamatorias como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-2, IL-6, IL-8, citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10 y citoquinas quimiotácticas como la proteína atrayente de monocitos (MCP-1), RANTES, MIG/CXCL9 y IP-10/CXCL10. El valor obtenido se muestra en las tablas 14, 15 y 16.

#### 6.3.1-Células

Al comparar los valores de las células obtenidos en cada paciente antes y después del desarrollo de BOS se observó un aumento significativo de los neutrófilos y los linfocitos en el BAL tras el diagnóstico de rechazo crónico, contrario de lo observado con los macrófagos que descienden significativamente (Tabla 14, Figura 21, 22, 23).

Tabla 14: Celularidad del BAL antes y después del rechazo crónico

	BASAL (%)	BOS (%)	Valor p
Macrófagos	86 (60-91)	48 (22-66)	0.0001*
Neutrófilos	5 (3-12)	11 (7-40)	0.0008*
Linfocitos	3.7 (1.7-12)	10.8 (4.4-33)	0.0106*

Datos son presentados como medianas (p25-p75). P<0.05\*

Figura 21: Evolución de los macrófagos antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

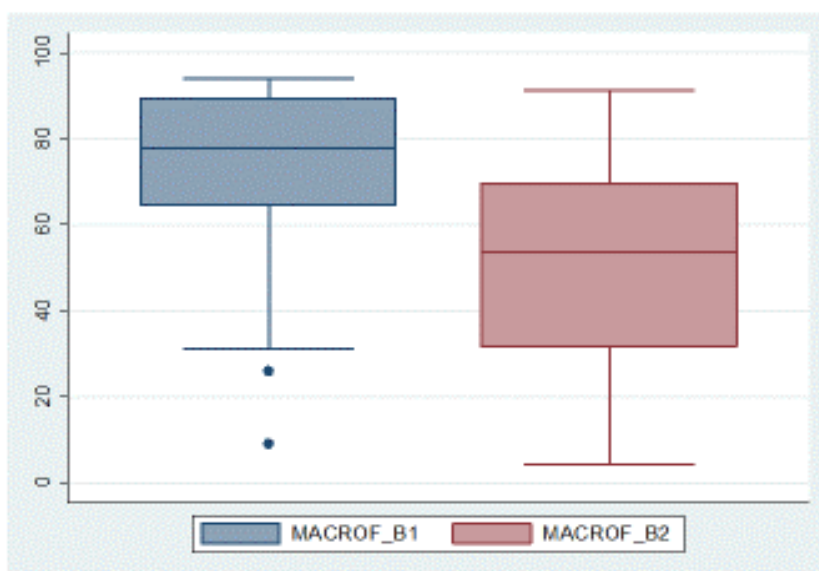


Figura 22: Evolución de los neutrófilos antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

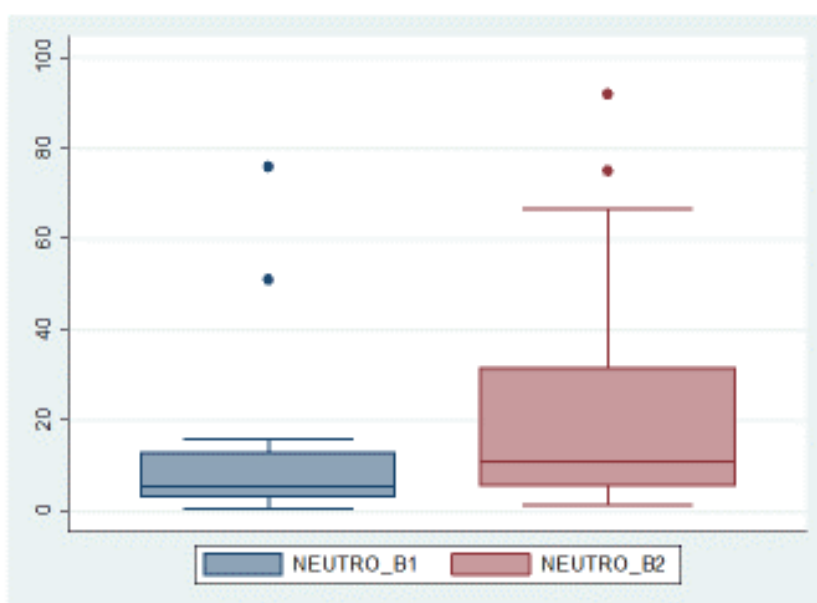
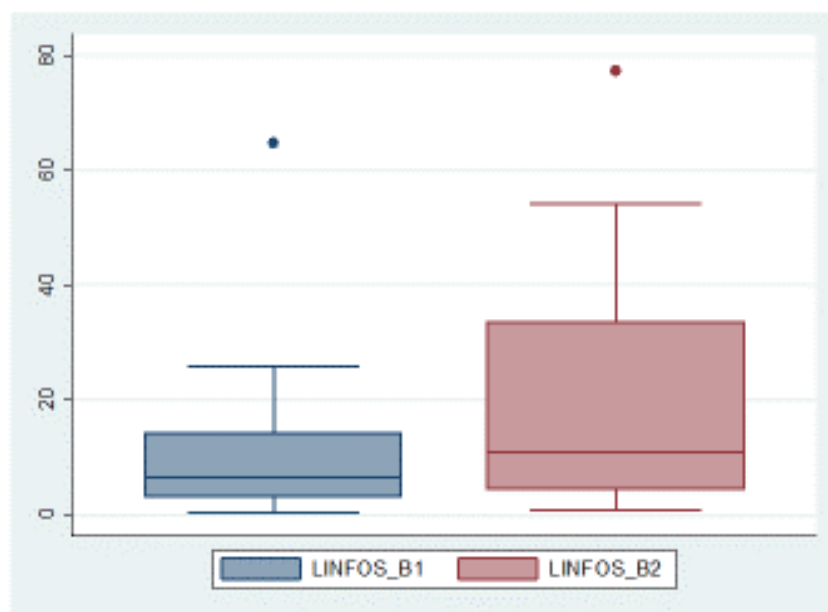


Figura 23: Evolución de los linfocitos antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS



La evolución de las diferentes subpoblaciones de linfocitos se muestran en la tabla 15. A destacar el descenso significativo de los linfocitos TCD4 (Tabla 15, Figura 24).

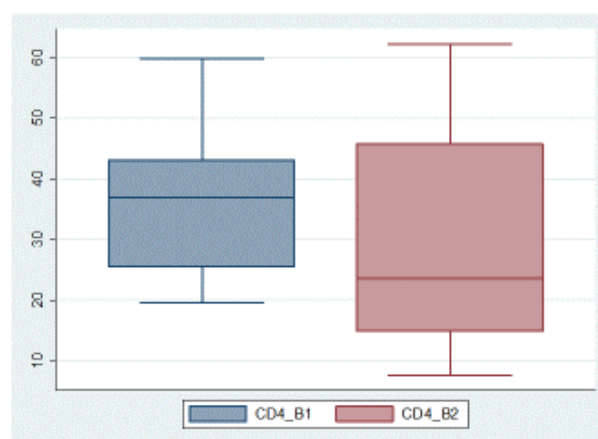
No se observó diferencia estadísticamente significativa en el resto de subpoblaciones linfocitarias.

Tabla 15: Análisis de las subpoblaciones de los linfocitos

	BASAL (%)	BOS (%)	Valor p
CD4	36 (22-59)	23 (7-62)	0.0046*
CD8	43 (15-67)	47 (12-81)	0.52
NK (CD56)	7 (0.9-39)	6 (0.6-50)	0.91
CD19	3 (0.6-34)	2 (0.5-20)	0.17
CD4CD25	11 (0.4-27)	12 (0.9-21)	0.15
CD8CD25	9 (0-26)	9 (0-31)	0.65
CD4CD45RA	0.6 (0-2)	0.2 (0-4)	0.75
CD4CD45RO	35 (4-55)	24 (10-52)	0.09
CD8CD45RA	3 (1-10)	3 (0.3-7)	0.51
CD8CD45RO	36 (4-66)	56 (28-66)	0.13

Datos son presentados como medianas (p25-p75). P<0.05\*

Figura 24: Evolución de los de linfocitos TCD4 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS





### 6.3.2- Citoquinas

En la tabla 16 se muestra la evolución de los valores obtenidos en el análisis de las citoquinas. Se observa un incremento significativo de las citoquinas proinflamatorias tras el desarrollo de BOS (IL-8, IL-6, MCP-1, IP-10, MIG, RANTES) (Figura 25, 26, 27, 28, 29, 30)

Tabla 16: Valor de las citoquinas antes y después del rechazo crónico

	BASAL (pg/ml)	BOS (pg/ml)	Valor p
IL-8	71 (21-210)	344 (83-131)	0.0000*
IL-6	3 (2-7)	15 (5-29)	0.000*
MCP-1	33 (16-131)	81 (26-416)	0.0335*
IP10/CXCI10	19 (10-84)	206 (106-479)	0.0003*
MIG/CXCL9	26 (5-159)	414 (153-982)	0.0005*
RANTES/CCL5	10 (3-10)	10 (9-17)	0.0049*
IFN	0 (0-1.2)	0.165 (0-1.4)	0.43
TNF	0 (0-1.4)	0.7 (0-1.9)	0.09
IL-10	0 (0-1.4)	0 (0-1.81)	0.95
IL-2	0 (0-1.2)	0 (0-0.56)	0.25
IL-4	0 (0-0.2)	0 (0.008)	0.95

Datos son presentados como medianas (p25-p75).  $P < 0.05^*$

Figura 25: Valor de IL-8 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

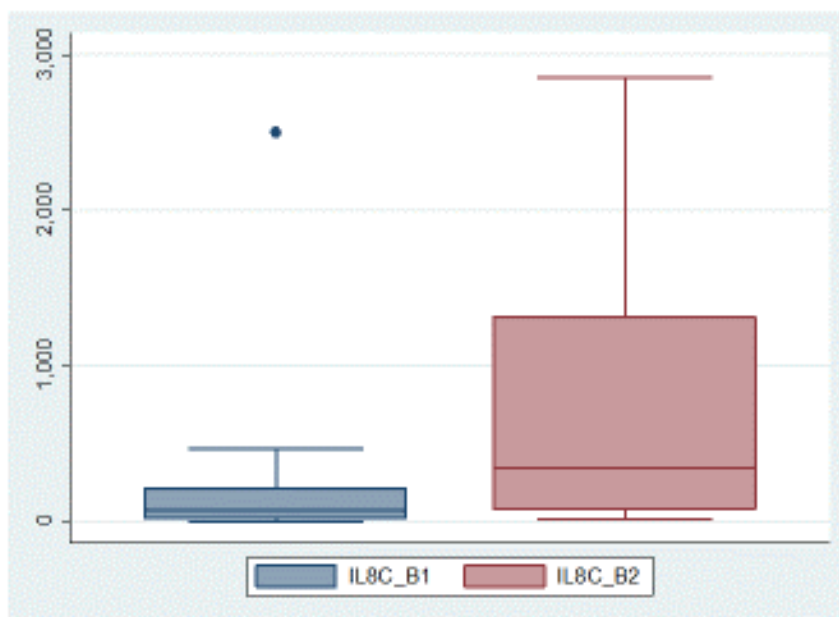


Figura 26: Valor de IL-6 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

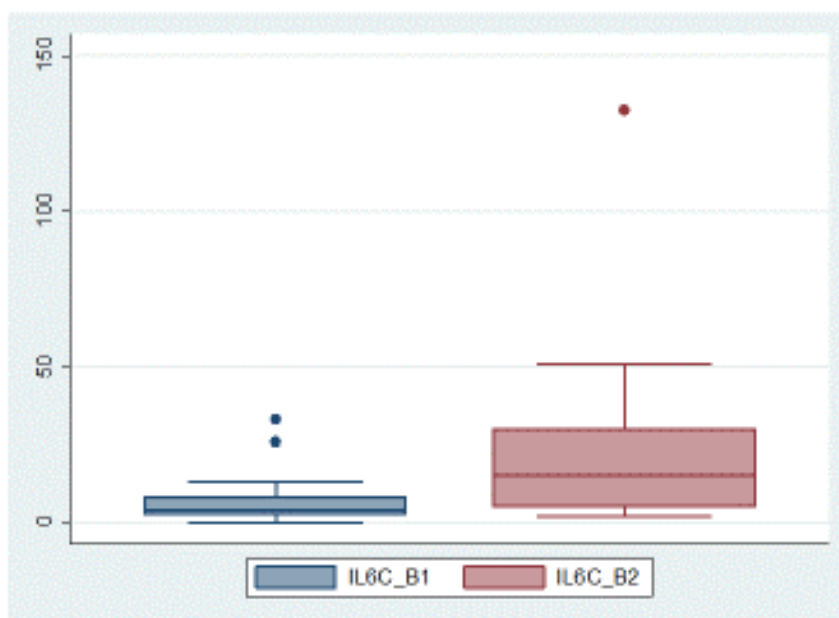


Figura 27: Valor de MCP-1 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

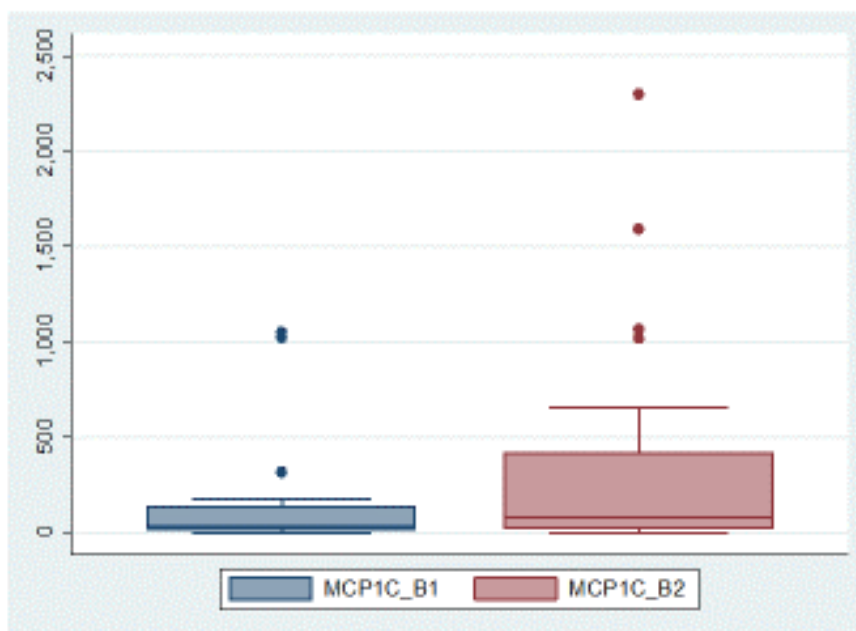


Figura 28: Valor de IP-10 antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

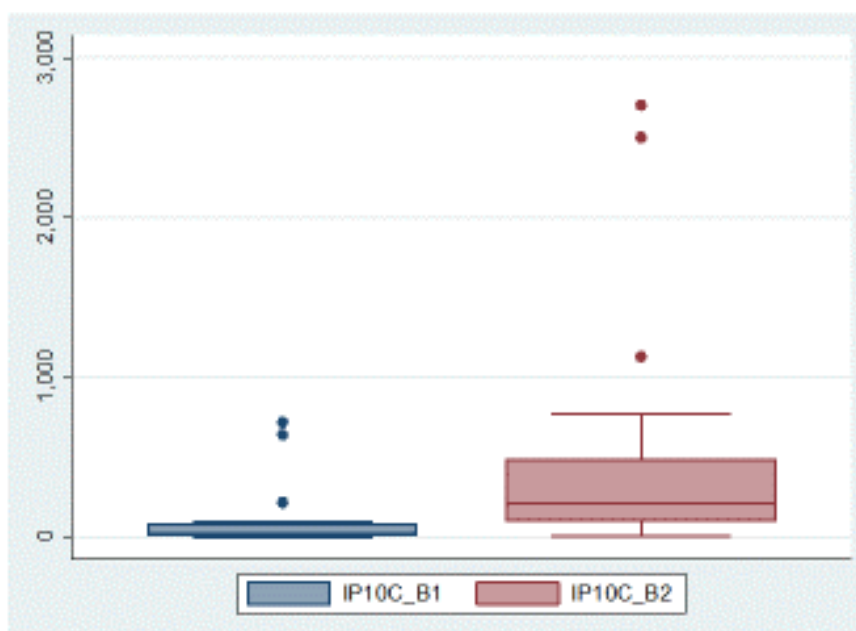


Figura 29: Valor de MIG antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS

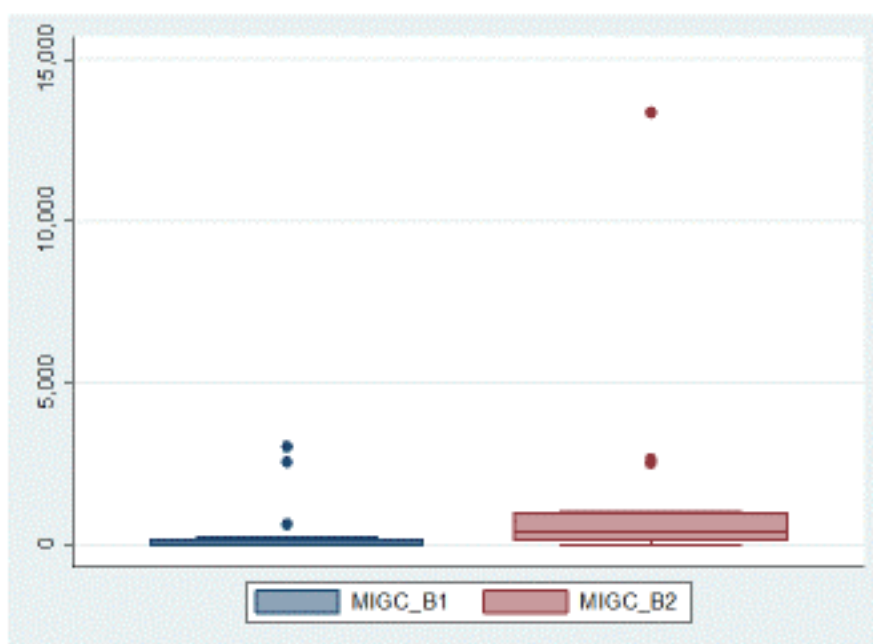
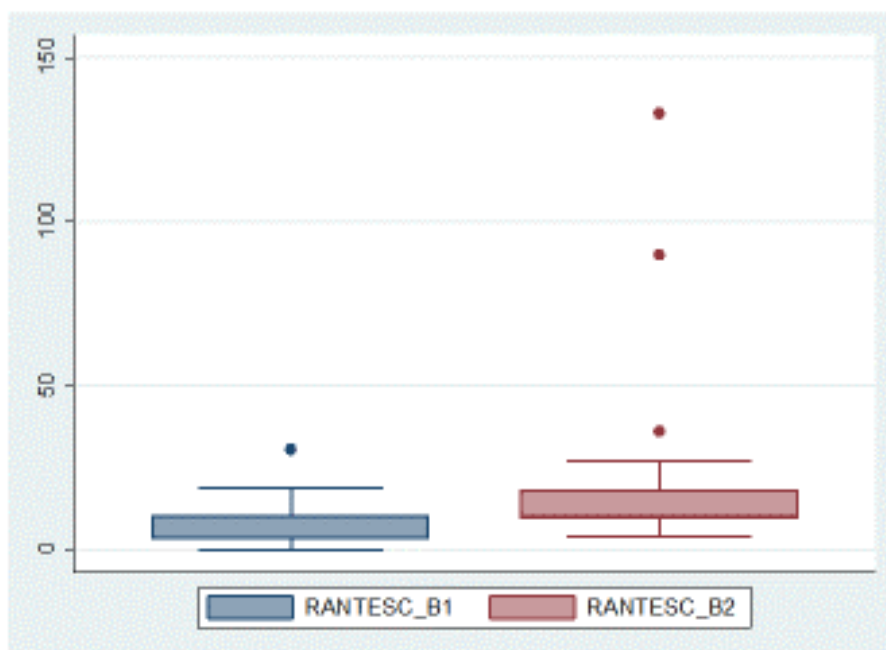


Figura 30: Valor de RANTES antes (B1) y después (B2) del desarrollo de BOS



No se observaron diferencias significativas tras el desarrollo de rechazo en las citoquinas: INF, TNF, IL10, IL2, IL4.

### 6.3.3-Análisis de correlaciones

Tras los resultados obtenidos se realizó un análisis de correlación entre las células, las citoquinas, y los datos de ambas con el deterioro de la función pulmonar.

#### 6.3.3.1 Correlación entre las citoquinas

En la tabla 17 mostramos la correlación entre las citoquinas proinflamatorias antes y después del desarrollo del rechazo crónico. A destacar la correlación de la IL-8 con la IL-6 y la MCP-1 previo al BOS, la IL-8 con MIG antes y después del desarrollo de BOS.

Tabla 17: Análisis de la correlación entre citoquinas

<b>CITOQUINAS</b>		<b>IL-8 (Pre-BOS)</b>	<b>IL-8 (Post-BOS)</b>
<b>IL-6 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	,708	,626
	Sig (bilateral)	,000	,000
<b>IL-6 (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	,113	,483
	Sig (bilateral)	,573	,011
<b>MCP-1 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	,717	,665
	Sig (bilateral)	,000	,000
<b>MCP-1 (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,063	,161
	Sig (bilateral)	,756	,424
<b>IP-10 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,059	,111
	Sig (bilateral)	,795	,621
<b>IP-10 (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,015	,030
	Sig (bilateral)	,948	,896
<b>MIG (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	,654	,677
	Sig (bilateral)	,001	,001
<b>MIG (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	,953	,613
	Sig (bilateral)	,000	,002
<b>RANTES (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	,058	-,032
	Sig (bilateral)	,798	,886
<b>RANTES (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,085	-,007
	Sig (bilateral)	,708	,974

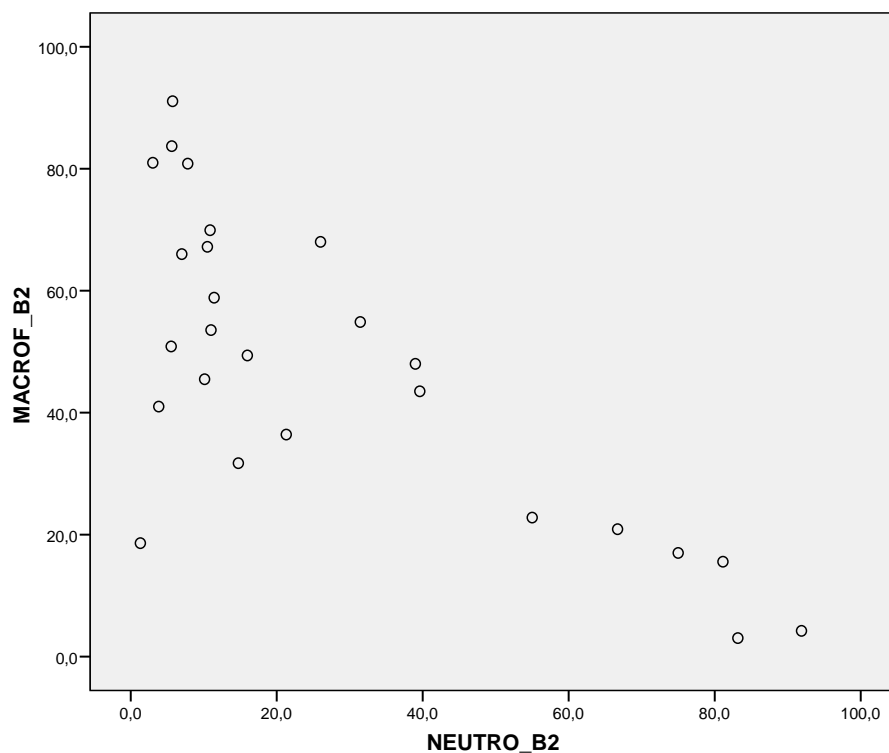
### 6.3.3.2. Correlación entre las células

- Al correlacionar las células entre sí observamos la correlación inversa relevante entre los neutrófilos y macrófagos antes y después del rechazo (Tabla 18 y Figura 31)

Tabla 18: Análisis de la correlación entre las células

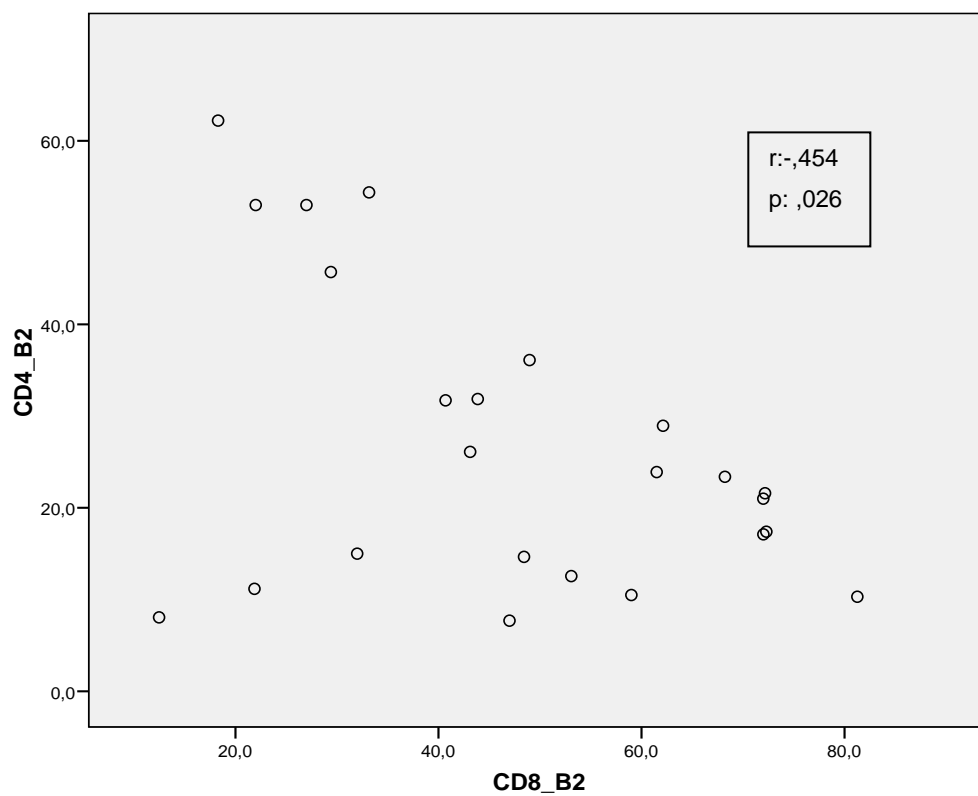
Células		Neutrófilos (Pre-BOS)	Neutrófilos (Post-BOS)
<b>Macrófagos (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	-, 807	-,437
	Sig (bilateral)	,000	,037
<b>Macrófagos (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,490	-,755
	Sig (bilateral)	,018	,000
<b>Linfocitos (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,151	-,256
	Sig (bilateral)	,481	,203
<b>Linfocitos (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson	-,413	-,521
	Sig (bilateral)	,050	,006

Figura 31: Correlación entre los neutrófilos y los macrófagos



- En la figura 32 se muestra la correlación inversa entre los linfocitos TCD4+ y los linfocitos TCD8+ antes y después del desarrollo de BOS.

Figura 32: Correlación entre los linfocitos CD4 y CD8 en el rechazo crónico

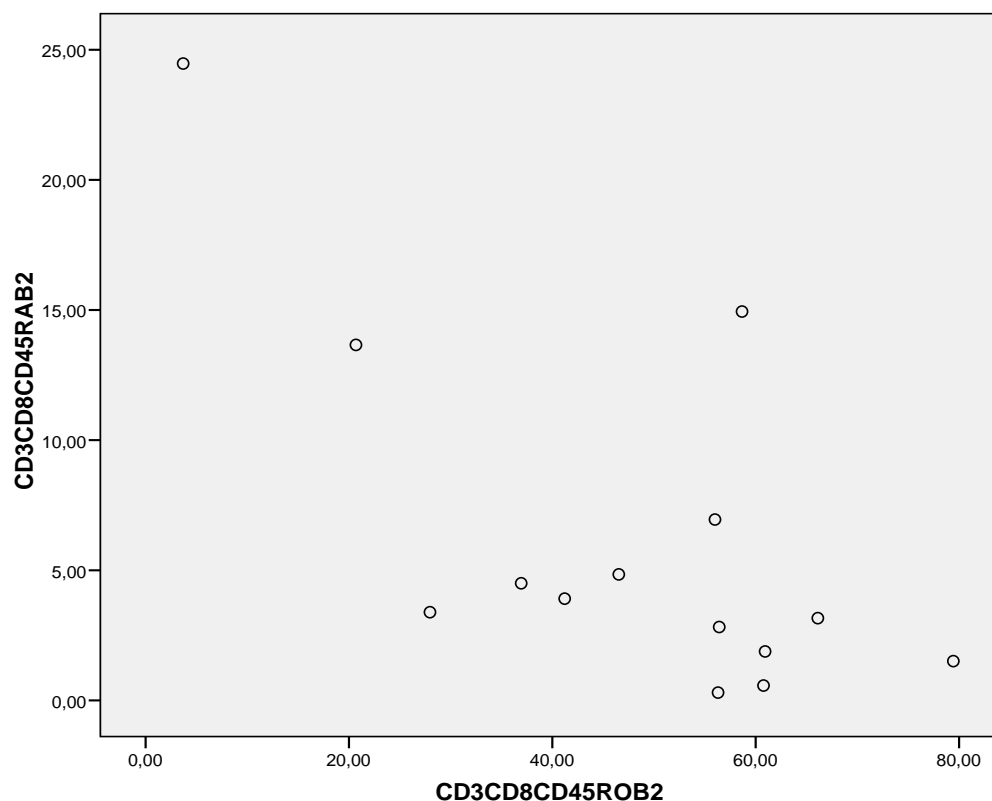


-Tras el rechazo crónico observamos una correlación inversa entre los Linfocitos TCD3CD8 naive (CD45RA) y los linfocitos TCD3CD8 de memoria (CD45RO) (Tabla 19, Figura 33)

Tabla 19: Análisis de la correlación entre subtipos de linfocitos T

Subtipos de linfocitos T	CD3CD8CD45RO (Pre-BOS)	CD3CD8CD45RO (Post-BOS)
CD3CD8CD45RA (Pre-BOS) correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,678 ,045	,316 ,408
CD3CD8CD45RA (Post-BOS) correlación de Pearson Sig (bilateral)	,240 ,534	-,686 ,007

Figura 33: Correlación entre los subtipos de linfocitos T en el rechazo crónico



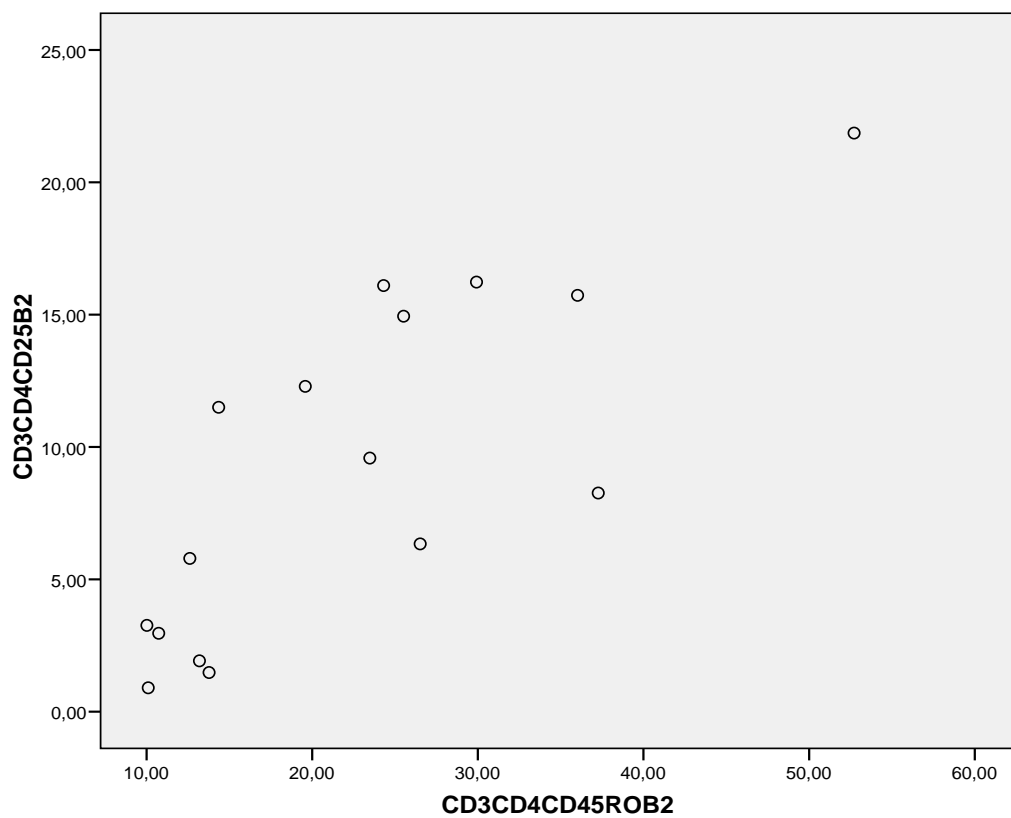


-En la tabla 20 se muestra la correlación entre diferentes subtipos de linfocitos antes y después del desarrollo del BOS. A remarcar la correlación entre linfocitos TCD4CD25 con los linfocitos TCD4 de memoria (CD45RO) (Figura 34)

Tabla 20: Análisis de la correlación entre subtipos de linfocitos T

Subtipos de linfocitos T		CD3CD4CD25 (Pre-BOS)	CD3CD4CD25 (Post-BOS)
CD3CD8CD25 (Pre-BOS)	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,465 ,150	,732 ,0.10
CD3CD8CD25 (Post-BOS)	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,256 ,447	,527 ,025
CD3CD4CD45RA (Pre-BOS)	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,219 ,517	-,745 ,009
CD3CD4CD45RA (Post-BOS)	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,121 ,722	-,332 ,209
CD3CD4CD45RO (Pre-BOS)	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,819 ,002	,275 ,413
CD3CD4CD45RO (Pos-BOS)	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,328 ,324	,788 ,000

Figura 34: Correlación entre linfocitos CD4CD25 y linfocitos CD4 de memoria (CD45RO) tras el desarrollo del rechazo crónico



### 6.3.3.3. Correlación entre las citoquinas y las células

Al correlacionar las citoquinas proinflamatorias y quimiotácticas y las células antes y después del rechazo crónico se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 21, 22). Destacamos la correlación relevante entre la IL-8 y los neutrófilos tanto antes como después del BOS (Figura 35)

Tabla 21: Análisis de la correlación entre células y citoquinas

<b>Célula</b>	<b>Citoquina (IL-8)</b>		<b>Citoquina (IL-6)</b>		<b>Citoquina (MCP-1)</b>	
	(Pre-BOS)	(Post-BOS)	(Pre-BOS)	(Post-BOS)	(Pre-BOS)	(Post-BOS)
<b>Macrófagos (Pre-BOS)</b> correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,614 ,001	-,470 ,021	-,343 ,101	,137 ,524	-,656 ,000	,080 ,710
<b>Macrófagos (Post-BOS)</b> correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,388 ,050	-,445 ,023	-,112 ,585	,057 ,782	-,366 ,066	-,139 ,497
<b>Linfocitos (Pre-BOS)</b> correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,195 ,360	-,229 ,281	-,230 ,279	-,157 ,465	-,097 ,651	-,057 ,790
<b>Linfocitos (Pos-BOS)</b> correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,278 ,170	-,461 ,018	-,300 ,137	-,134 ,515	-,296 ,142	-,108 ,601
<b>Neutrófilos (Pre-BOS)</b> correlación de Pearson Sig (bilateral)	,837 ,000	,683 ,000	,555 ,005	-,031 ,887	,782 ,000	-,037 ,862
<b>Neutrófilos (Post-BOS)</b> correlación de Pearson Sig (bilateral)	,475 ,014	,683 ,000	,170 ,408	-,089 ,665	,452 ,020	,154 ,452

Tabla 22: Análisis de la correlación entre células y citoquinas

<b>Célula</b>	<b>Citoquina (IP-10)</b>		<b>Citoquina (MIG)</b>		<b>Citoquina (RANTES)</b>	
	(Pre-BOS)	(Post-BOS)	(Pre-BOS)	(Post-BOS)	(Pre-BOS)	(Post-BOS)
<b>Macrófagos (Pre-BOS)</b>						
correlación de Pearson	,078	,064	-,428	-,632	-,118	,079
Sig (bilateral)	,745	,789	,060	,003	,622	,741
<b>Macrófagos (Post-BOS)</b>						
correlación de Pearson	,228	,321	-,231	-,294	,121	,026
Sig (bilateral)	,319	,156	,313	,196	,601	,911
<b>Linfocitos (Pre-BOS)</b>						
correlación de Pearson	,067	,130	-,110	-,138	,332	,077
Sig (bilateral)	,780	,585	,644	,562	,153	,747
<b>Linfocitos (Pos-BOS)</b>						
correlación de Pearson	-,129	,023	-,240	-,242	,057	-,021
Sig (bilateral)	,578	,921	,295	,290	,807	,928
<b>Neutrófilos (Pre-BOS)</b>						
correlación de Pearson	-,148	-,173	,543	,800	-,091	-,025
Sig (bilateral)	,534	,465	,013	,000	,704	,917
<b>Neutrófilos (Post-BOS)</b>						
correlación de Pearson	-,119	-,317	,341	,361	-,185	-,026
Sig (bilateral)	,609	,161	,130	,108	,422	,910

En relación con la IL-8:

Al analizar la correlación entre la IL-8 con el resto de células, destacamos la correlación con la célula NK bright (CD 56+ CD16-) tras el desarrollo de BOS (Figura 36) y CD19 (Figura 37) (Tabla 23).

Tabla 23: Correlación entre la IL-8 y las células

<b>Célula</b>		<b>Citoquina (IL-8) (Pre-BOS)</b>	<b>Citoquina (IL-8) (Post-BOS)</b>
<b>CD56 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,156 ,477	,356 ,095
<b>CD56 (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,157 ,452	,498 ,011
<b>CD 56+ CD16-CD3 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,367 ,296	-,303 ,395
<b>CD 56+ CD16-CD3 (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,893 ,000	,877 ,000
<b>CD19 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,047 ,863	-,084 ,757
<b>CD19 (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,809 ,000	,733 ,001

Figura 35: Correlación entre la IL-8 y los neutrófilos tras el desarrollo del rechazo crónico

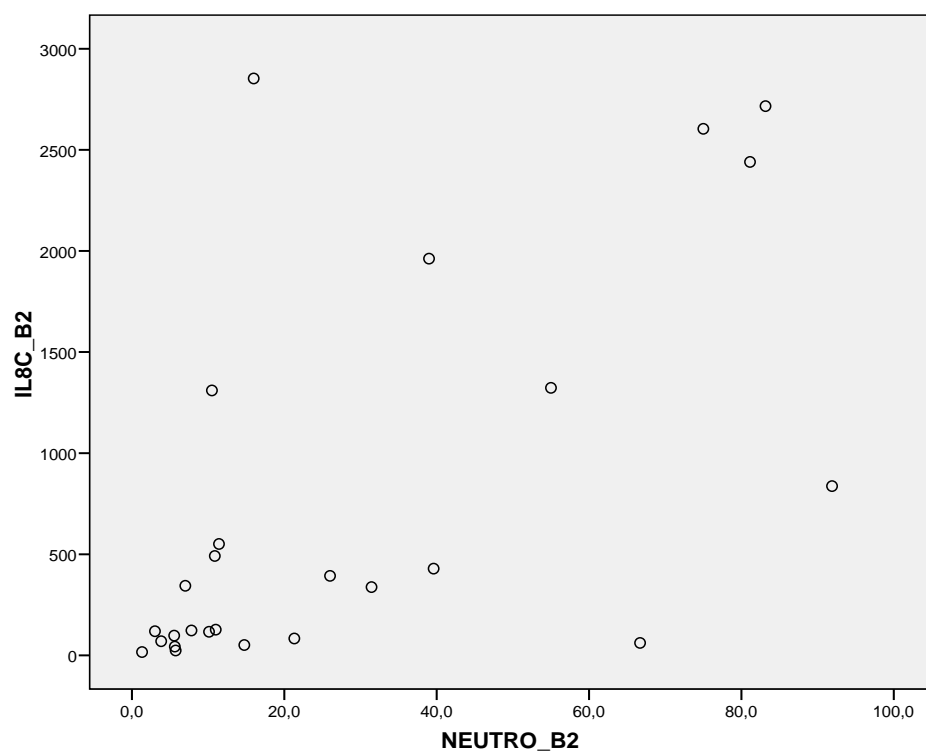


Figura 36: Correlación entre la IL-8 y CD56+CD16-CD3 (Post-BOS)

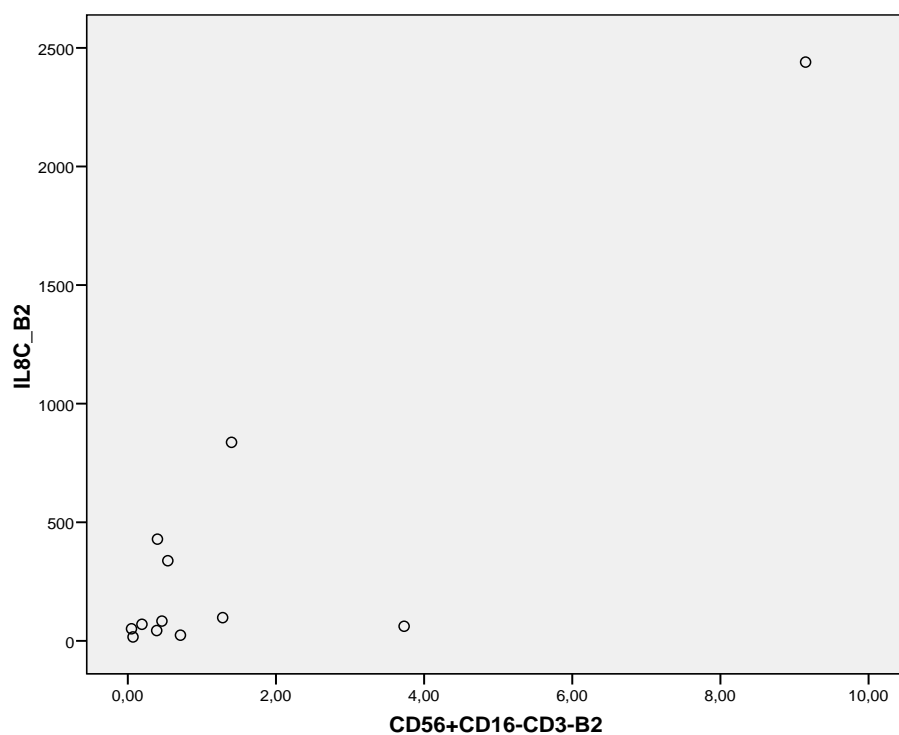
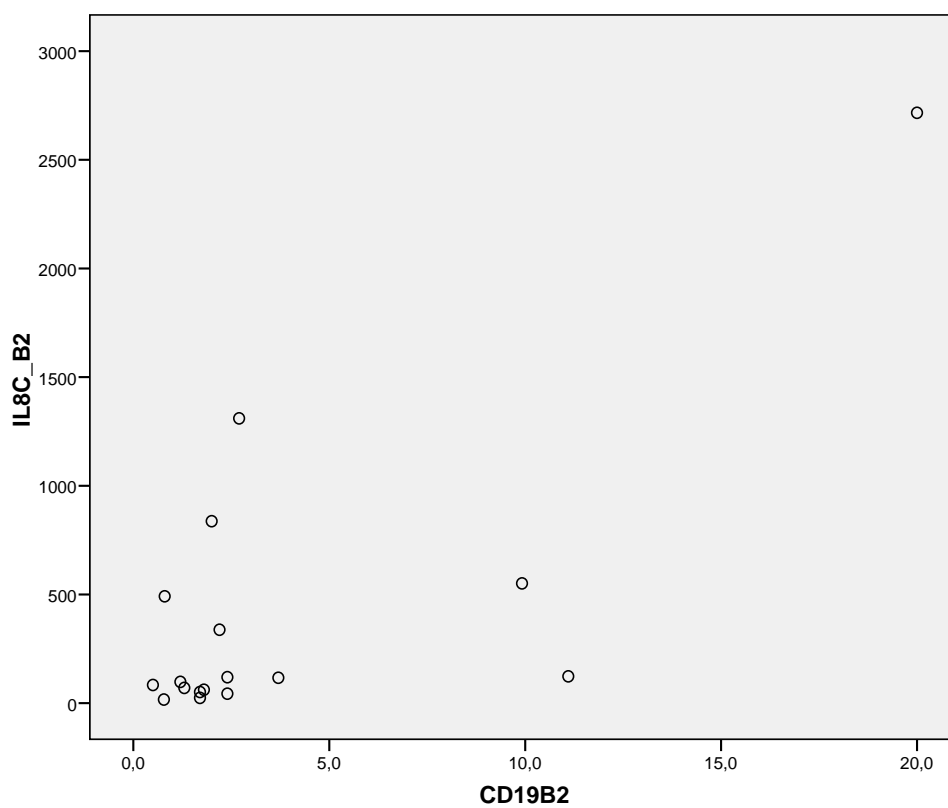


Figura 37: Correlación entre la IL-8 y los linfocitos CD19+ tras el desarrollo del rechazo crónico



En relación con la IL-6 (Tabla 24):

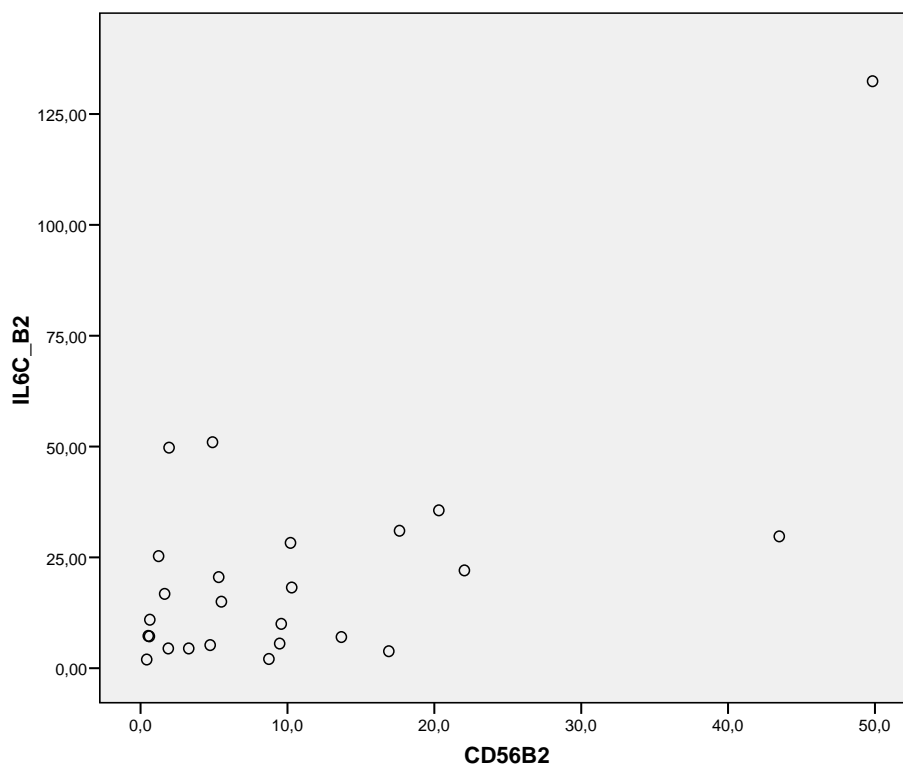
- En la tabla 24 destacamos la correlación entre la IL-6 y las células NK (CD56) después del desarrollo del rechazo crónico (Figura 38)

-

Tabla 24: Correlación entre la IL-6 y las células

Célula		Citoquina (IL-6) (Pre-BOS)	Citoquina (IL-6) (Post-BOS)
<b>CD56 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,479 ,021	,594 ,003
<b>CD56 (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,603 ,001	,650 ,000
<b>CD3CD4CD45RO (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,090 ,793	-,301 ,368
<b>CD3CD4CD45RO (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,475 ,063	-,513 ,042

Figura 38: Correlación entre la IL-6 y células CD56 (NK) tras el rechazo crónico





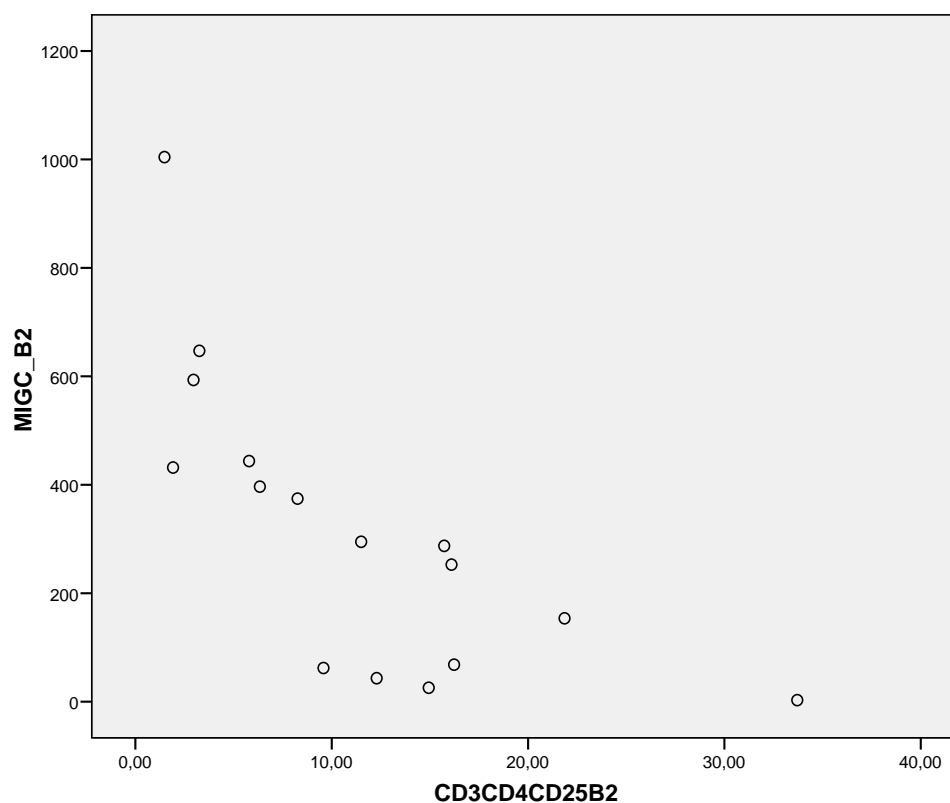
En relación con la MIG (Tabla 25):

- La citoquina MIG tras el rechazo presenta una correlación inversa con los linfocitos activados (CD3CD4CD25) (Figura 39)
- Tras el rechazo crónico existe una correlación entre la MIG y con los linfocitos CD19

Tabla 25: Análisis de la correlación entre la MIG y las células

<b>Célula</b>		<b>Citoquina (MIG) (Pre-BOS)</b>	<b>Citoquina (MIG) (Post-BOS)</b>
<b>CD3CD4CD25 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,735 ,015	-,643 ,045
<b>CD3CD4CD25 (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,295 ,267	-,731 ,001
<b>CD3CD8CD25 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,702 ,024	-,600 ,067
<b>CD3CD8CD25 (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,309 ,244	-,513 ,042
<b>CD19 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,061 ,828	0,48 ,865
<b>CD19 (Pos-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,849 ,000	,874 ,000

Figura 39: Correlación inversa entre la citoquina MIG y los linfocitos CD3CD4CD25 (Post-BOS)



En relación con RANTES (Tabla 26):

- Presentamos resultados de la correlación entre la citoquina RANTES tras el rechazo con la célula NK dim (CD56+CD16+CD3)

Tabla 26: Análisis de la correlación entre RANTES y las células

Célula		Citoquina (RANTES) (Pre-BOS)	Citoquina (RANTES) (Post-BOS)
<b>CD56+CD16+CD3 (Pre-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	-,091 ,817	-,041 ,916
<b>CD56+CD16+CD3 (Post-BOS)</b>	correlación de Pearson Sig (bilateral)	,419 ,199	,624 ,040

#### 6.3.3.4. Analizar la correlación de la función pulmonar y las células

Se analizó la pérdida de la función pulmonar desde el FEV1 basal hasta el seguimiento a los 6 meses del diagnóstico del BOS. Se observó por un lado correlación inversa entre el porcentaje de pérdida de la función pulmonar y el porcentaje de los subtipos de linfocitos T CD8 naive (CD45RA) (Figura 40) y por otro lado correlación positiva entre la caída de la función pulmonar y el subtipo de linfocitos TCD8 de memoria (CD45RO) tras el desarrollo del rechazo crónico (Figura 41).

Figura 40: Correlación entre la pérdida de la función pulmonar (%) (FEV1 basal - 6 meses postrasplante) y el porcentaje de linfocitos TCD8 naive (CD45RA)

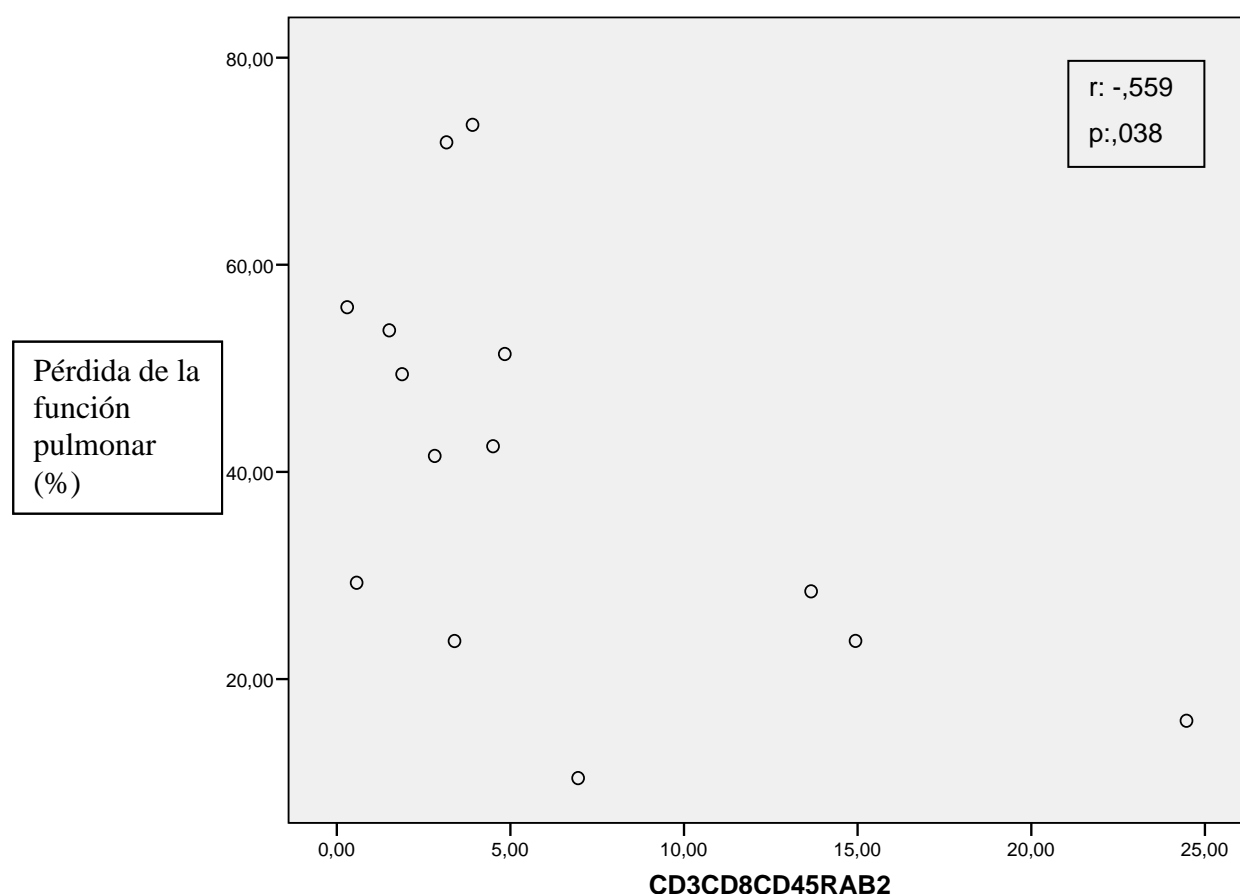
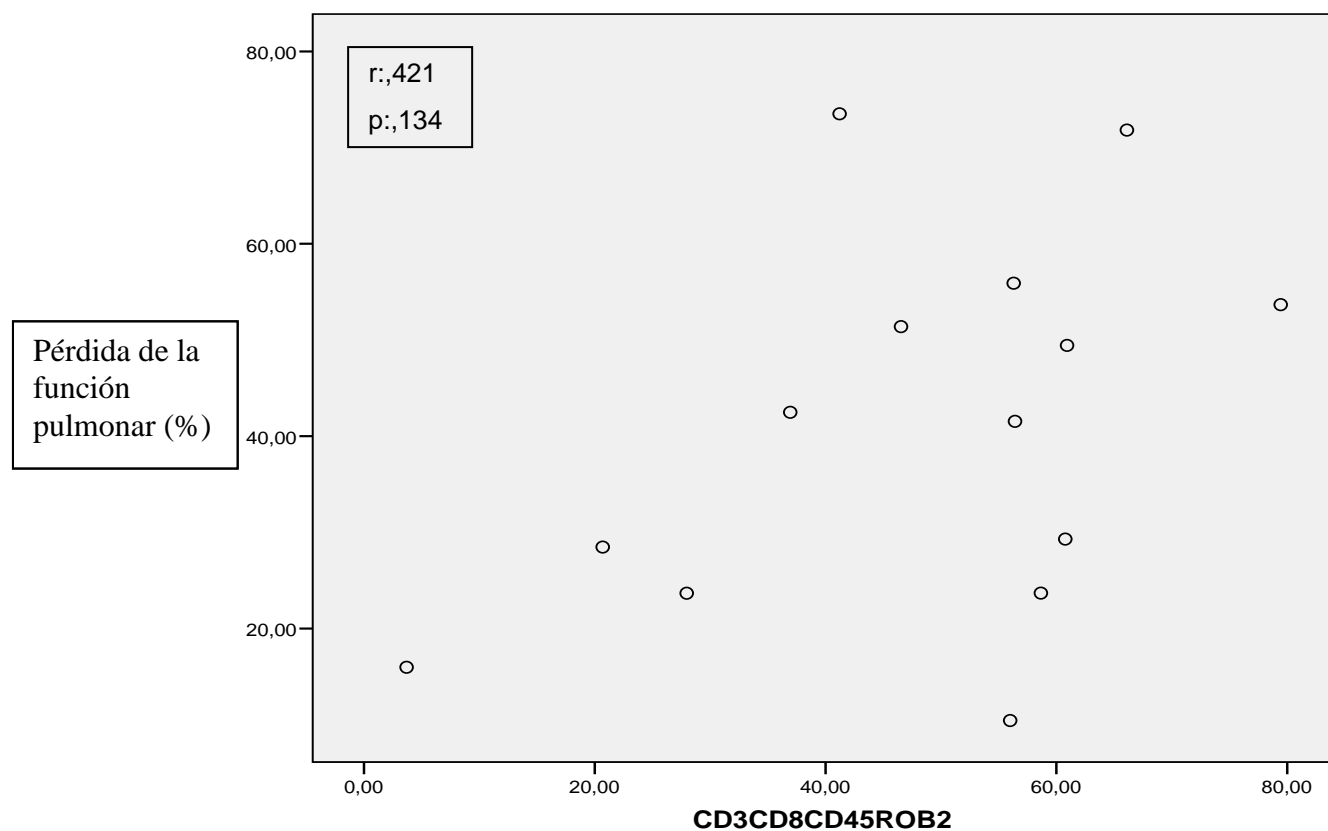


Figura 41: Correlación entre la pérdida de la función pulmonar (%) (FEV1 basal - 6 meses postrasplante) y subtipo de linfocitos TCD8 de memoria (CD45RO)



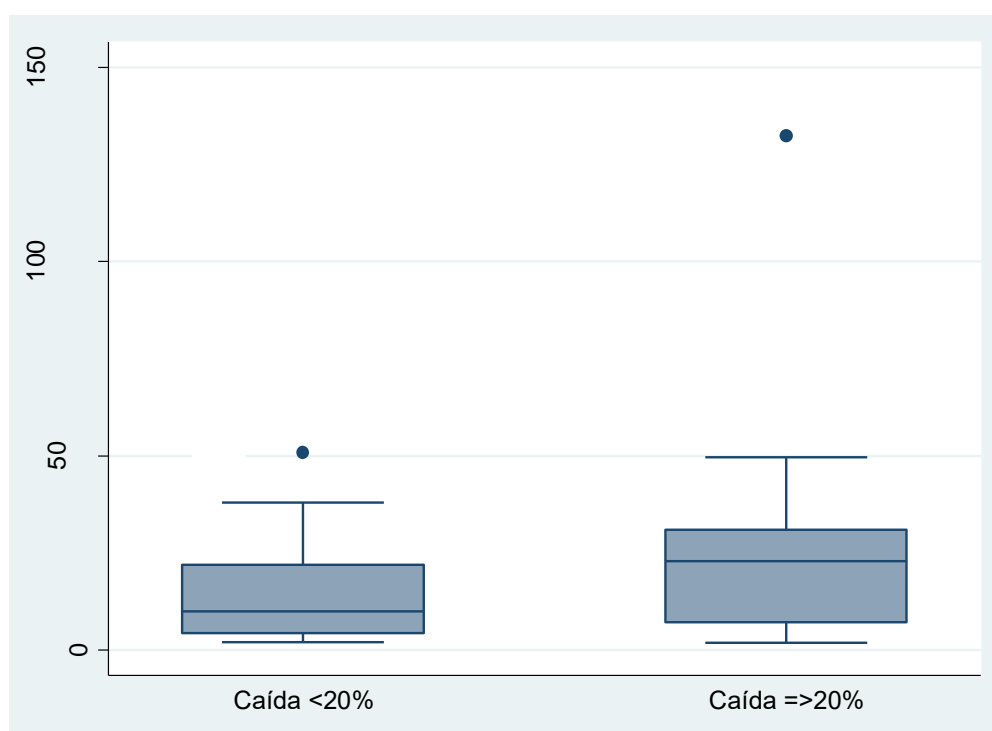
- En la Tabla 27 y Figura 42 se muestra la mediana de la IL-6 en el momento del diagnóstico de la BOS con deterioro acelerado de la función pulmonar.

Tabla 27: Valor de la IL6 en el momento del diagnóstico de BOS

Citoquina	<20% descenso de la función pulmonar	>20% descenso de la función pulmonar	p
IL-6 (Post-BOS)	10 (4,5; 22,0)	22,9 (7,2; 31,0)	0.043*

Datos son presentados como medianas (p25-p75). P<0.05\*

Figura 42: Valor de la IL-6 y el descenso de la función pulmonar



---

## ***Discusión***

---

El examen de la composición celular y de las citoquinas y proteínas del BAL nos ofrece una ventana al microambiente del injerto pulmonar, y nos puede sugerir los mecanismos fisiopatológicos (inflamatorios, del estrés oxidativo, angiogénesis, remodelado de la matriz, fibrosis y reflujo) que contribuyen al desarrollo y progresión de la CLAD <sup>47</sup>. Los resultados de este estudio ponen en evidencia los cambios en el perfil de células y de citoquinas en el BAL de receptores con rechazo crónico. Existen múltiples investigaciones y estudios cuyo máximo esfuerzo se centra en el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo del rechazo crónico y en su forma de tratarlo. Su entendimiento nos ayudará a obtener el diagnóstico y la detección precoz del rechazo crónico. El interés de estos hallazgos, es debido a que la supervivencia a largo plazo de los receptores de trasplante pulmonar está condicionada por el desarrollo de disfunción crónica del injerto, siendo la principal causa de mortalidad después del primer año del trasplante. La probabilidad de desarrollar rechazo crónico aumenta con el tiempo de supervivencia post-trasplante, y afecta al 12% de los receptores al primer año y a más del 50% a los 5 años<sup>1</sup>.

### **Celularidad en el lavado broncoalveolar**

Al analizar los valores de las células obtenidos en cada paciente antes y después del desarrollo de BOS se observó un aumento del porcentaje de neutrófilos y linfocitos en el BAL tras el diagnóstico de rechazo crónico, con un descenso significativo de los macrófagos.

Como en nuestro estudio, la mayoría de los trabajos publicados muestran aumento de neutrófilos en el lavado broncoalveolar de los pacientes con BOS . Reynaud Gaubert et al. <sup>75</sup> observaron además que un conteo >20% de neutrófilos podría tener un valor predictivo para identificar receptores con riesgo de desarrollar rechazo crónico. Está por definir si el aumento de estos neutrófilos en el BAL de bronoscopias protocolizadas es anterior al declinar de la función pulmonar. Quizás a raíz de estudios como el nuestro se demuestre una utilidad de la FBS suficiente para detectar precozmente complicaciones que haga incorporar la realización de la prueba de forma protocolizada.

Kennedy et al.<sup>48</sup> mostraron que a mayor porcentaje de neutrófilos en el BAL mayor estadio del BOS. En nuestro estudio la mayoría de nuestros pacientes se encontraban en el momento del diagnóstico de BOS un grado  $\leq$  I, el 80% de los receptores con Grado II tenían valores de neutrófilos  $> 25\%$ .

A pesar de que los neutrófilos han sido históricamente asociados con el desarrollo del rechazo crónico, recientemente se ha definido un nuevo fenotipo de disfunción crónica del injerto<sup>91</sup>, que responde favorablemente al tratamiento con azitromicina, denominada disfunción del injerto neutrofílica reversible<sup>92 93</sup>. Se caracteriza por presentar aumento de neutrófilos en el BAL  $>15\%$ <sup>94,95</sup>.

En nuestro estudio ningún paciente presentaba este fenotipo, ya que no se observó mejoría funcional tras el diagnóstico de BOS. El aumento de neutrófilos también se ha descrito por el grupo de Hannover, como predictor de respuesta a otra terapia, la fotoaféresis extracorpórea, el cual indica el mecanismo inflamatorio de estos pacientes<sup>96</sup>.

En un estudio<sup>51</sup> donde comparaban las células del BAL que había en pacientes sanos, receptores con rechazo agudo, receptores con infección y receptores con BOS, observaron un aumento de neutrófilos en los últimos tres grupos (RA, infección, BOS). El aumento de neutrófilos  $> 43\%$  tenía una especificidad del 94% asociada a BOS.

En cuanto a los linfocitos, hemos observado un aumento significativo del porcentaje total de linfocitos tras el rechazo crónico con un descenso también significativo de los linfocitos TCD4+. Si comparamos nuestros datos con lo publicado, podemos ver que diferentes estudios han comparado la composición celular del lavado broncoalveolar de pacientes con BOS, receptores estables sin rechazo crónico y población sana. Entre ellos, Zheng et al.<sup>63</sup> al observó que el porcentaje total de linfocitos en el BAL de receptores de trasplante pulmonar era similar al grupo control y no había cambios significativos en el tiempo postrasplante. Sin embargo, tras la cirugía existía un porcentaje menor de linfocitos CD4+ y mayor de linfocitos CD8+ en el lavado broncoalveolar de los pacientes sin rechazo crónico, respecto a la población sana, alteración que era más evidente en pacientes que desarrollaban BOS. En nuestro estudio los linfocitos se han medido en el BAL del mismo receptor en dos tiempos distintos, antes y después del desarrollo del rechazo crónico. La existencia de



una correlación inversa entre los subtipos CD4 y CD8 apoya la implicación de los linfocitos citotóxicos en el desarrollo de la bronquiolitis obliterante.

Whitehead et al.<sup>61</sup> observaron, como en nuestro análisis, un aumento del porcentaje de linfocitos totales en pacientes con BOS, aunque en su caso no llegó a la significación estadística.

El receptor CD25 identifica la presencia de linfocitos T activados. Slebos et al.<sup>57</sup> mostraron mayor porcentaje de linfocitos CD4CD25 y CD8CD45 en pacientes con rechazo crónico frente a un grupo control, posiblemente indicando el desarrollo de respuesta aloinmune. En nuestro estudio no observamos diferencias significativas en este subtipo de linfocitos, tras el desarrollo de BOS, probablemente debido al pequeño número de pacientes incluidos. Sin embargo, los linfocitos TCD4CD25 se correlacionaron con los linfocitos TCD4 de memoria (CD45RO), tras la BOS, lo que puede ser reflejo de la implicación de la respuesta aloinmune la aparición de los linfocitos con marcadores de activación y de memoria<sup>66</sup>.

Los linfocitos CD 56+ (células NK)<sup>65</sup> juegan un papel significativo en la defensa del organismo frente a diversos agentes infecciosos. Durante mucho tiempo se las consideró implicadas principalmente en la inmunidad innata, pero hoy en día se sabe que también juegan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa y cada vez más se las está adjudicando una función inmunorreguladora. Las células NK pueden subdividirse en diferentes subpoblaciones basadas en la expresión diferencial en superficie de los marcadores CD16. Las células CD56dim/CD16+ se caracterizan por la expresión de receptores inhibidores de muerte (KIR) y receptores de citotoxicidad (NCR). Su función fundamental es su gran actividad citotóxica. Y las células CD56bright/CD16 - son un máximo de 10% de las NK circulantes, pero constituyen la mayoría de las células NK en los tejidos linfoides secundarios. Fenotípicamente se caracterizan por la ausencia de expresión de KIR y una expresión moderada de NCR. Presentan una actividad citotóxica muy débil, pero más eficientes en la producción de citoquinas.

No está muy claro el papel de las células NK en el desarrollo de la BOS. Su actividad es dual al formar parte del sistema inmune innato, como primera barrera frente a patógenos, y adquirir además capacidad citotóxica directa<sup>68</sup>. En nuestro estudio no observamos un incremento significativo tras el desarrollo

de BOS, pero si una correlación positiva con algunas de las principales citoquinas proinflamatorias (IL-8, IL-6). Además, el deterioro post-BOS de la función pulmonar se correlacionó con las células NK bright (CD56+CD16-CD3), lo que sugiere que terapias con acción frente a estas células como la fotoaféresis pueden enlentecer la progresión de la enfermedad.

El desarrollo del rechazo crónico parece depender de la potencia de la respuesta aloinmune, determinada por la disparidad antigénica entre donante y receptor y por la interacción de factores alogénicos y no alogénicos, que potencian la propia aloreactividad <sup>3</sup>. Entre dichos factores se encuentra la respuesta humoral. La correlación observada en nuestro estudio entre los linfocitos CD19 y las citoquinas inflamatorias como la IL-8 y la MIG después del diagnóstico de rechazo crónico, apoya la posible implicación de los linfocitos B en la disfunción del injerto.

### **Citoquinas en el lavado broncoalveolar**

En nuestro estudio determinamos antes y después del desarrollo del BOS las concentraciones de diferentes citoquinas inflamatorias como el interferón gamma (IFN $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral (TNF), la IL-2, IL-6, IL-8, citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 y la IL-10 y citoquinas quimiotácticas como la proteína atrayente de monocitos (MCP-1), RANTES, MIG/CXCL9 y IP-10/CXCL10. Observamos una elevación de citoquinas proinflamatorias IL-8 y IL-6 y de las citoquinas quimiotácticas MCP-1, IP-10, MIG, RANTES en el BAL de receptores con rechazo crónico. Estos resultados apoyan como causa de la bronquiolitis obliterante el daño causado directamente sobre las células epiteliales <sup>97</sup> y que la inflamación es parte del proceso del rechazo crónico. La alteración en el balance entre citoquinas pro- y anti-inflamatorias provocará el remodelado de la vía aérea <sup>47,70,98</sup>.

Diferentes estudios han evaluado una amplia variedad de citoquinas en el lavado broncoalveolar de pacientes con trasplante pulmonar <sup>74,75</sup>. La IL-8 ha demostrado ser el parámetro más consistente y reproducible en pacientes con rechazo crónico. Liberada principalmente por macrófagos alveolares y células

epiteliales, es la citoquina encargada del reclutamiento y la activación de neutrófilos después del trasplante. Algunos de los factores que pueden influir en aumentar su secreción es la presencia de ácidos biliares debido a la existencia de reflujo gastroesofágico <sup>37</sup>, así, como la exposición a la polución ambiental <sup>99</sup> o a las infecciones <sup>100</sup>. En nuestro estudio 26/27 pacientes elevaron significativamente los valores de IL-8 tras desarrollo de BOS. El aumento de neutrófilos y la elevación de la IL-8 en ausencia de infección o rechazo agudo se han identificado como predictores del BOS <sup>54</sup>. La correlación que hemos observado entre ambos parámetros, incluso antes del BOS, sugiere su papel como marcador más precoz que la caída de la función pulmonar para el diagnóstico del rechazo crónico.

Slebos et al <sup>57</sup> observaron que valores de la IL-8 > 71.4 pg/ml y de los neutrófilos >3% tienen una sensibilidad y especificidad alta para BOS (IL-8 > 71.4 pg/ml: S:87%, E:83%; neutrófilos >3%: S:87%, E:77%). Tras el desarrollo de rechazo crónico el 81% de nuestros pacientes tenían un valor de IL-8 > 71 pg/ml y de neutrófilos > 3% el 96% de los receptores. Por tanto, y de acuerdo con su conclusión el análisis de células y citoquinas en el BAL parece ser un parámetro útil para el diagnóstico de BOS.

Mamessier et al <sup>73</sup> detectaron una correlación inversa de la IL-8 y el aumento de neutrófilos con la función pulmonar. Por tanto la monitorización de estos parámetros nos ayudarían a la monitorización de la evolución del rechazo crónico.

La IL-6 ha demostrado prolongar la vida media y la activación de los linfocitos T, por tanto, incrementa la aloreactividad entre los linfocitos T y la célula epitelial <sup>79</sup>.

El papel de la IL-6 y la MPC-1 en la patogénesis del rechazo crónico está establecido <sup>79,80</sup>. En nuestro estudio hemos observado que los niveles de IL-6 están significativamente más altos tras el diagnóstico de BOS. Además, al diferenciar a los pacientes con deterioro del FEV1 mayor o menor del 20% en el momento del diagnóstico del BOS, observamos que los pacientes con mayor pérdida de función presentaban cifras de IL-6 significativamente superiores. Aunque son necesarios más estudios al respecto, la IL-6 puede ser útil para identificar de forma precoz un fenotipo de CLAD con progresión rápida de la función pulmonar.

Magnan et al <sup>79</sup> describió un aumento de la secreción de IL-6 por los macrófagos alveolares, tras complicaciones agudas como rechazo agudo y neumonitis por CMV, desencadenando un daño tisular, que provocaba la activación tardía de citoquinas antiinflamatorias, TGF- $\beta$ , para su reparación. En procesos inflamatorios crónicos este patrón de secreción de citoquinas es constante desarrollando la fibrosis.

La MCP-1 es una citoquina pro-fibrógena que ha sido relacionada con la atracción de linfocitos T de memoria y la diferenciación de monocitos en macrófagos productores de fibrina. Reynaud-Gaubert et al<sup>75</sup> observaron una correlación positiva entre MCP-1 y la IL-8. En nuestro estudio observamos un aumento significativo de la misma tras el desarrollo de la BOS. Algunos datos publicados sugieren un perfil dinámico de secreción de citoquinas en el BAL de pacientes con BOS, que va desde el postrasplante inmediato hasta que la complicación es clínicamente evidente. En el estudio de Scholma et al <sup>80</sup> mostraron que niveles altos de IL-6 y MCP-1 pueden ser encontrados durante los primeros meses postrasplante, acompañados de niveles normales de IL-8 en pacientes que más tarde desarrollaron BOS. En un estudio posterior <sup>57</sup> mostró que los niveles de IL-6 se normalizaban tras el desarrollo del rechazo crónico. Por tanto, posiblemente la IL-6 juegue un papel importante en el diagnóstico de BOS en estadios iniciales como citoquina pro-inflamatoria. La IL-6 es liberada por las células epiteliales inflamatorias y los macrófagos alveolares tras la agresión inicial y reiterativa del epitelio por diferentes factores de riego descritos previamente. La expresión de IL-8 y MCP-1 pueden contribuir al mantenimiento del proceso inflamatorio/fibroproliferativo en la vía aérea durante largo tiempo y esto dar lugar al paso del rechazo agudo al crónico.

En relación con la MIG y la IP-10, principales citoquinas quimiotácticas, observamos un aumento significativo tras el diagnóstico de BOS. Neujahr et al. <sup>86</sup> mostraron que niveles altos de MIG/CXCL9 y IP10/CXCI10 en el BAL de receptores de trasplante de pulmón incrementaba el riesgo de desarrollar rechazo crónico. Nuestros datos muestran también un aumento significativo de la IP-10 y MIG tras el desarrollo del BOS, por tanto a pesar de que su mayor papel se les ha dado en los procesos agudos <sup>83</sup>, la IP-10 y la MIG parecen tener implicación en el desarrollo del rechazo crónico. Además, observamos

una correlación positiva entre la citoquina inflamatoria IL-8 y la citoquina quimiotáctica de linfocitos T activados MIG.

Otra de las citoquinas que aumenta en nuestro estudio tras el diagnóstico de BOS es la RANTES, cuya principal función conocida es la quimiotaxis de los linfocitos T de memoria (TCD4) <sup>75</sup>, facilitando su migración y activación. Reynaud-Gaubert et al <sup>75</sup> asoció la expresión de RANTES con acúmulo de linfocitos en el espacio alveolar, indicando que RANTES puede mediar en el flujo de linfocitos del injerto. Belperio et al <sup>101</sup> observaron que pacientes con rechazo agudo tenían incremento de los niveles de RANTES comparado con receptores sanos. Los hallazgos de ambos estudios sugieren que RANTES contribuye al desarrollo de BOS, por un lado con la migración de linfocitos TCD4 y por otro como co-factor en el proceso inflamatorio precoz del rechazo allogénico agudo.

La IL-10, es una citoquina asociada a la respuesta inmune tipo Th2 con actividad inmunomoduladora. No está muy claro el papel que ejerce en el rechazo del injerto, aunque hay artículos que sugieren su potencial como biomarcador de tolerancia. Zheng et al <sup>102</sup> observó que la IL-10 en el BAL de pacientes con trasplante pulmonar les protegía de rechazo agudo persistente. Nosotros no encontramos diferencias significativas en nuestro estudio, una posible explicación es que todos nuestros receptores desarrollaron rechazo crónico, no existe un grupo control sin rechazo para valorar diferencia.

Recientemente se han descrito diferentes fenotipos de la disfunción crónica del injerto, los principales el BOS y el RAS. Existen diversos estudios que tratan de analizar células y/o citoquinas que ayuden a predecir su desarrollo. Aunque en nuestro estudio sólo seleccionamos receptores con BOS, probablemente este sea nuestro trabajo futuro que complemente los datos obtenidos del actual.

Verleden et al. <sup>21</sup> analizaron citoquinas y células en el BAL de pacientes estables, pacientes con BOS y pacientes con RAS. Encontraron que el aumento del porcentaje de neutrófilos era un marcador que aparecía en ambos fenotipos y que la IL-6 y a la IP-10 actuaban como marcadores del RAS. El aumento del porcentaje de eosinófilos en el BAL y en sangre periférica se asociaba a peor supervivencia tras el diagnóstico de CLAD restrictiva. Berastegui et al <sup>76</sup> observaron , como en estudios anteriores, aumento de

neutrófilos en el BAL como constante en el BOS y en el RAS, e identifica la IL-5 como potencial biomarcador del fenotipo restrictivo.

Aunque existen estudios en animales y humanos que han demostrado una interacción importante en la patogénesis del rechazo crónico, entre citoquinas y receptor, hoy en día no están incluidas en la práctica clínica, son necesarios futuros estudios con biomarcadores que clarifiquen su importancia en el trasplante pulmonar.

Las limitaciones de este estudio son que se trata de un trabajo retrospectivo con la consiguiente pérdida de información, esto probablemente limite la posibilidad de detectar más diferencias. Fue realizado en un solo centro, con relativo pequeño tamaño muestral. Además, en nuestra unidad las FBS no se realizan de forma protocolizada, por tanto, el momento en que se realiza la FBS respecto al BOS es diferente en cada paciente, tanto antes como después de su desarrollo. Aunque por otro lado, la significación de los datos obtenidos dan a entender que las alteraciones del BOS son independientes del tiempo de evolución.

En resumen, tras el desarrollo de disfunción crónica del injerto observamos cambios significativos en el perfil de citoquinas y células del BAL. Estos cambios pueden traducir un desbalance en el microambiente del injerto secundario a la lesión de la célula epitelial y cambios reparativos con remodelado de la vía aérea. Por tanto, la determinación seriada de citoquinas y células en el BAL después del trasplante pulmonar puede reflejar actividad inflamatoria del injerto y ser de utilidad para el diagnóstico, el pronóstico y la elección de las distintas opciones de tratamiento en los receptores que desarrollan BOS.

Aunque son necesarios estudios prospectivos protocolizados que abalen estas afirmaciones, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que el análisis seriado de células, entre la que se encuentran los neutrófilos, y linfocitos citotóxicos (Células NK y TCD8), junto con las citoquinas inflamatorias (IL-8, IL-6) y quimiotácticas (IP-10, RANTES, MIG y MCP-1) pueden facilitar el reconocimiento precoz de la disfunción tardía del injerto y su evolución posterior.

---

**Conclusiones**

Tras el desarrollo de rechazo crónico se observaron cambios significativos en el perfil de células y citoquinas del BAL.

El aumento de neutrófilos y de la IL-8 refleja actividad inflamatoria en el microambiente pulmonar en probable relación con la lesión en la célula epitelial y remodelado de la vía aérea.

La monitorización de células y citoquinas en el BAL de los receptores de trasplante pulmonar puede ser útil para el reconocimiento precoz de la disfunción tardía del injerto y su evolución posterior.



---

## **Bibliografía**

1. Yusen RD, Edwards LB, Dipchand AI, Goldfarb SB, Kucheryavaya AY, Levvey BJ, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-third Adult Lung and Heart-Lung Transplant Report-2016; Focus Theme: Primary Diagnostic Indications for Transplant. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. octubre de 2016;35(10):1170-84.
2. [www.ont.es](http://www.ont.es).
3. Knoop C, Estenne M. Chronic allograft dysfunction. *Clin Chest Med*. junio de 2011;32(2):311-26.
4. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A, et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. Julio de 2011;30(7):735-42.
5. Verleden SE, Ruttens D, Vandermeulen E, Bellon H, Dubbeldam A, De Wever W, et al. Predictors of survival in restrictive chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. septiembre de 2016;35(9):1078-84.
6. Vos R, Verleden SE, Verleden GM. Chronic lung allograft dysfunction: evolving practice. *Curr Opin Organ Transplant*. octubre de 2015;20(5):483-91.
7. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans After Lung Transplantation. *Chest*. julio de 2016;150(1):219-25.
8. Evers A, Atanasova S, Fuchs-Moll G, Petri K, Wilker S, Zakrzewicz A, et al. Adaptive and innate immune responses in a rat orthotopic lung transplant model of chronic lung allograft dysfunction. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. enero de 2015;28(1):95-107.
9. Husain AN, Siddiqui MT, Holmes EW, Chandrasekhar AJ, McCabe M, Radvany R, et al. Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. marzo de 1999;159(3):829-33.
10. Hayes D. A review of bronchiolitis obliterans syndrome and therapeutic strategies. *J Cardiothorac Surg*. 18 de julio de 2011;6:92.
11. Aguilar PR, Michelson AP, Isakow W. Obliterative Bronchiolitis. *Transplantation*. febrero de 2016;100(2):272-83.
12. Sánchez-Fueyo A, Strom TB. Immunologic basis of graft rejection and tolerance following transplantation of liver or other solid organs. *Gastroenterology*. enero de 2011;140(1):51-64.
13. McManigle W, Pavlisko EN, Martinu T. Acute cellular and antibody-mediated allograft rejection. *Semin Respir Crit Care Med*. junio de 2013;34(3):320-35.

14. Martinu T, Pavlisko EN, Chen D-F, Palmer SM. Acute allograft rejection: cellular and humoral processes. *Clin Chest Med.* junio de 2011;32(2):295-310.
15. Weigt SS, Wallace WD, Derhovanessian A, Saggar R, Saggar R, Lynch JP, et al. Chronic allograft rejection: epidemiology, diagnosis, pathogenesis, and treatment. *Semin Respir Crit Care Med.* abril de 2010;31(2):189-207.
16. Kulkarni HS, Bemiss BC, Hachem RR. Antibody-mediated Rejection in Lung Transplantation. *Curr Transplant Rep.* diciembre de 2015;2(4):316-23.
17. Petty M. Antibody-Mediated Rejection in Solid Organ Transplant. *AACN Adv Crit Care.* julio de 2016;27(3):316-23.
18. Cook DN, Bottomly K. Innate immune control of pulmonary dendritic cell trafficking. *Proc Am Thorac Soc.* julio de 2007;4(3):234-9.
19. Todd JL, Palmer SM. Bronchiolitis obliterans syndrome: the final frontier for lung transplantation. *Chest.* agosto de 2011;140(2):502-8.
20. Andrade CF, Waddell TK, Keshavjee S, Liu M. Innate immunity and organ transplantation: the potential role of toll-like receptors. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* mayo de 2005;5(5):969-75.
21. Royer P-J, Olivera-Botello G, Koutsokera A, Aubert J-D, Bernasconi E, Tissot A, et al. Chronic Lung Allograft Dysfunction: A Systematic Review of Mechanisms. *Transplantation.* septiembre de 2016;100(9):1803-14.
22. Samano MN, Fernandes LM, Baranauskas JCB, Correia AT, Afonso JE, Teixeira RHOB, et al. Risk factors and survival impact of primary graft dysfunction after lung transplantation in a single institution. *Transplant Proc.* octubre de 2012;44(8):2462-8.
23. Gámez García P, Laporta Hernández R. *Transplante pulmonar.* Madrid: Ergon; 2013.
24. Chmiel C, Speich R, Hofer M, Michel D, Mertens T, Weder W, et al. Ganciclovir/valganciclovir prophylaxis decreases cytomegalovirus-related events and bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 de marzo de 2008;46(6):831-9.
25. Snyder LD, Finlen-Copeland CA, Turbyfill WJ, Howell D, Willner DA, Palmer SM. Cytomegalovirus pneumonitis is a risk for bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de junio de 2010;181(12):1391-6.
26. Paraskeva M, Bailey M, Levvey BJ, Griffiths AP, Kotsimbos TC, Williams TP, et al. Cytomegalovirus replication within the lung allograft is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg.* octubre de 2011;11(10):2190-6.
27. Ruttman E, Geltner C, Bucher B, Ulmer H, Höfer D, Hangler HB, et al. Combined CMV prophylaxis improves outcome and reduces the risk for

- bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) after lung transplantation. Transplantation. 27 de mayo de 2006;81(10):1415-20.
28. Botha P, Archer L, Anderson RL, Lordan J, Dark JH, Corris PA, et al. Pseudomonas aeruginosa colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. Transplantation. 15 de marzo de 2008;85(5):771-4.
  29. Vos R, Vanaudenaerde BM, Geudens N, Dupont LJ, Van Raemdonck DE, Verleden GM. Pseudomonal airway colonisation: risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation? Eur Respir J. mayo de 2008;31(5):1037-45.
  30. Gregson AL, Wang X, Weigt SS, Palchevskiy V, Lynch JP, Ross DJ, et al. Interaction between Pseudomonas and CXC chemokines increases risk of bronchiolitis obliterans syndrome and death in lung transplantation. Am J Respir Crit Care Med. 1 de marzo de 2013;187(5):518-26.
  31. Borthwick LA, Suwara MI, Carnell SC, Green NJ, Mahida R, Dixon D, et al. Pseudomonas aeruginosa Induced Airway Epithelial Injury Drives Fibroblast Activation: A Mechanism in Chronic Lung Allograft Dysfunction. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. junio de 2016;16(6):1751-65.
  32. Garantziotis S, Palmer SM. An unwelcome guest: Aspergillus colonization in lung transplantation and its association with bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. agosto de 2009;9(8):1705-6.
  33. Weigt SS, Elashoff RM, Huang C, Ardehali A, Gregson AL, Kubak B, et al. Aspergillus colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. agosto de 2009;9(8):1903-11.
  34. Mertens V, Blondeau K, Van Oudenhove L, Vanaudenaerde B, Vos R, Farre R, et al. Bile acids aspiration reduces survival in lung transplant recipients with BOS despite azithromycin. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. febrero de 2011;11(2):329-35.
  35. D'Ovidio F, Mura M, Ridsdale R, Takahashi H, Waddell TK, Hutcheon M, et al. The effect of reflux and bile acid aspiration on the lung allograft and its surfactant and innate immunity molecules SP-A and SP-D. Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg. agosto de 2006;6(8):1930-8.
  36. Stovold R, Forrest IA, Corris PA, Murphy DM, Smith JA, Decalmer S, et al. Pepsin, a biomarker of gastric aspiration in lung allografts: a putative association with rejection. Am J Respir Crit Care Med. 15 de junio de 2007;175(12):1298-303.
  37. D'Ovidio F, Mura M, Tsang M, Waddell TK, Hutcheon MA, Singer LG, et al. Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. J Thorac Cardiovasc Surg. mayo de 2005;129(5):1144-52.

38. Nawrot TS, Vos R, Jacobs L, Verleden SE, Wauters S, Mertens V, et al. The impact of traffic air pollution on bronchiolitis obliterans syndrome and mortality after lung transplantation. *Thorax*. septiembre de 2011;66(9):748-54.
39. Bhinder S, Chen H, Sato M, Copes R, Evans GJ, Chow C-W, et al. Air pollution and the development of posttransplant chronic lung allograft dysfunction. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. diciembre de 2014;14(12):2749-57.
40. Benmerad M, Slama R, Botturi K, Claustre J, Roux A, Sage E, et al. Chronic effects of air pollution on lung function after lung transplantation in the Systems prediction of Chronic Lung Allograft Dysfunction (SysCLAD) study. *Eur Respir J*. enero de 2017;49(1).
41. Wilkes DS, Heidler KM, Bowen LK, Quinlan WM, Doyle NA, Cummings OW, et al. Allogeneic bronchoalveolar lavage cells induce the histology of acute lung allograft rejection, and deposition of IgG2a in recipient murine lungs. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de septiembre de 1995;155(5):2775-83.
42. Sumpter TL, Wilkes DS. Role of autoimmunity in organ allograft rejection: a focus on immunity to type V collagen in the pathogenesis of lung transplant rejection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. junio de 2004;286(6):L1129-1139.
43. Burlingham WJ, Love RB, Jankowska-Gan E, Haynes LD, Xu Q, Bobadilla JL, et al. IL-17-dependent cellular immunity to collagen type V predisposes to obliterative bronchiolitis in human lung transplants. *J Clin Invest*. noviembre de 2007;117(11):3498-506.
44. Weber DJ, Wilkes DS. The role of autoimmunity in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 1 de marzo de 2013;304(5):L307-311.
45. Subramanian V, Ramachandran S, Banan B, Bharat A, Wang X, Benshoff N, et al. Immune response to tissue-restricted self-antigens induces airway inflammation and fibrosis following murine lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. octubre de 2014;14(10):2359-66.
46. Hachem RR, Tiriveedhi V, Patterson GA, Aloush A, Trulock EP, Mohanakumar T. Antibodies to K- $\alpha$  1 tubulin and collagen V are associated with chronic rejection after lung transplantation. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. agosto de 2012;12(8):2164-71.
47. Hodge G, Hodge S, Chambers D, Reynolds PN, Holmes M. Bronchiolitis obliterans syndrome is associated with absence of suppression of peripheral blood Th1 proinflammatory cytokines. *Transplantation*. 27 de julio de 2009;88(2):211-8.
48. Kennedy VE, Todd JL, Palmer SM. Bronchoalveolar lavage as a tool to predict, diagnose and understand bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. marzo de 2013;13(3):552-61.

49. Verleden SE, Ruttens D, Vos R, Vandermeulen E, Moelants E, Mortier A, et al. Differential cytokine, chemokine and growth factor expression in phenotypes of chronic lung allograft dysfunction. *Transplantation*. enero de 2015;99(1):86-93.
50. Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, De Vleeschauwer SI, Willems-Widyastuti A, Van Raemdonck DE, et al. Bronchoalveolar lavage neutrophilia in acute lung allograft rejection and lymphocytic bronchiolitis. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. noviembre de 2010;29(11):1259-69.
51. Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Gregoire R, Badier M, Cau P, Sampol J, et al. Clinical utility of bronchoalveolar lavage cell phenotype analyses in the postoperative monitoring of lung transplant recipients. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. enero de 2002;21(1):60-6.
52. Fisichella PM, Davis CS, Lowery E, Ramirez L, Gamelli RL, Kovacs EJ. Aspiration, localized pulmonary inflammation, and predictors of early-onset bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Am Coll Surg*. julio de 2013;217(1):90-100; discussion 100-101.
53. Vanaudenaerde BM, Wuyts WA, Geudens N, Nawrot TS, Vos R, Dupont LJ, et al. Broncho-alveolar lavage fluid recovery correlates with airway neutrophilia in lung transplant patients. *Respir Med*. marzo de 2008;102(3):339-47.
54. Neurohr C, Huppmann P, Samweber B, Leuschner S, Zimmermann G, Leuchte H, et al. Prognostic value of bronchoalveolar lavage neutrophilia in stable lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. mayo de 2009;28(5):468-74.
55. Suwara MI, Vanaudenaerde BM, Verleden SE, Vos R, Green NJ, Ward C, et al. Mechanistic differences between phenotypes of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *Transpl Int Off J Eur Soc Organ Transplant*. agosto de 2014;27(8):857-67.
56. Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Badier M, Cau P, Giudicelli R, Fuentes P. Early detection of airway involvement in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. Functional and bronchoalveolar lavage cell findings. *Am J Respir Crit Care Med*. junio de 2000;161(6):1924-9.
57. Slebos D-J, Postma DS, Koëter GH, Van Der Bij W, Boezen M, Kauffman HF. Bronchoalveolar lavage fluid characteristics in acute and chronic lung transplant rejection. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. mayo de 2004;23(5):532-40.
58. Verleden SE, Vandermeulen E, Ruttens D, Vos R, Vaneylen A, Dupont LJ, et al. Neutrophilic reversible allograft dysfunction (NRAD) and restrictive allograft syndrome (RAS). *Semin Respir Crit Care Med*. junio de 2013;34(3):352-60.
59. Verleden GM, Vanaudenaerde BM, Dupont LJ, Van Raemdonck DE. Azithromycin reduces airway neutrophilia and interleukin-8 in patients with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de septiembre de 2006;174(5):566-70.

60. Ward C, Snell GI, Zheng L, Orsida B, Whitford H, Williams TJ, et al. Endobronchial biopsy and bronchoalveolar lavage in stable lung transplant recipients and chronic rejection. *Am J Respir Crit Care Med*. julio de 1998;158(1):84-91.
61. Whitehead BF, Stoehr C, Finkle C, Patterson G, Theodore J, Clayberger C, et al. Analysis of bronchoalveolar lavage from human lung transplant recipients by flow cytometry. *Respir Med*. enero de 1995;89(1):27-34.
62. Greenland JR, Jewell NP, Gottschall M, Trivedi NN, Kukreja J, Hays SR, et al. Bronchoalveolar lavage cell immunophenotyping facilitates diagnosis of lung allograft rejection. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. abril de 2014;14(4):831-40.
63. Zheng L, Orsida B, Whitford H, Levvey B, Ward C, Walters EH, et al. Longitudinal comparisons of lymphocytes and subtypes between airway wall and bronchoalveolar lavage after human lung transplantation. *Transplantation*. 27 de julio de 2005;80(2):185-92.
64. Bhorade SM, Chen H, Molinero L, Liao C, Garrity ER, Vigneswaran WT, et al. Decreased percentage of CD4+FoxP3+ cells in bronchoalveolar lavage from lung transplant recipients correlates with development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation*. 15 de septiembre de 2010;90(5):540-6.
65. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. abril de 2009;126(4):458-65.
66. Ward C, Whitford H, Snell G, Bao H, Zheng L, Reid D, et al. Bronchoalveolar lavage macrophage and lymphocyte phenotypes in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. octubre de 2001;20(10):1064-74.
67. Gregson AL, Hoji A, Saggar R, Ross DJ, Kubak BM, Jamieson BD, et al. Bronchoalveolar immunologic profile of acute human lung transplant allograft rejection. *Transplantation*. 15 de abril de 2008;85(7):1056-9.
68. Meehan AC, Sullivan LC, Mifsud NA, Brooks AG, Snell GI, Kotsimbos TC, et al. Natural killer cell activation in the lung allograft early posttransplantation. *Transplantation*. 27 de marzo de 2010;89(6):756-63.
69. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 1 de agosto de 2008;112(3):461-9.
70. Kastelijn EA, Rijkers GT, Van Moorsel CHM, Zanen P, Kwakkel-van Erp JM, Van De Graaf EA, et al. Systemic and exhaled cytokine and chemokine profiles are associated with the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. septiembre de 2010;29(9):997-1008.
71. Meloni F, Vitulo P, Cascina A, Oggionni T, Bulgheroni A, Paschetto E, et al. Bronchoalveolar lavage cytokine profile in a cohort of lung transplant recipients: a

- predictive role of interleukin-12 with respect to onset of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. septiembre de 2004;23(9):1053-60.
72. Verleden SE, Vos R, Mertens V, Willems-Widyastuti A, De Vleeschauwer SI, Dupont LJ, et al. Heterogeneity of chronic lung allograft dysfunction: insights from protein expression in broncho alveolar lavage. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. junio de 2011;30(6):667-73.
  73. Mamessier E, Milhe F, Badier M, Thomas P, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. Comparison of induced sputum and bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. mayo de 2006;25(5):523-32.
  74. Elssner A, Jaumann F, Dobmann S, Behr J, Schwaiblmair M, Reichenspurner H, et al. Elevated levels of interleukin-8 and transforming growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. *Munich Lung Transplant Group. Transplantation*. 27 de julio de 2000;70(2):362-7.
  75. Reynaud-Gaubert M, Marin V, Thirion X, Farnarier C, Thomas P, Badier M, et al. Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. julio de 2002;21(7):721-30.
  76. Berastegui C, Gómez-Ollés S, Sánchez-Vidaurre S, Culebras M, Monforte V, López-Meseguer M, et al. BALF cytokines in different phenotypes of chronic lung allograft dysfunction in lung transplant patients. *Clin Transplant*. marzo de 2017;31(3).
  77. Berastegui C, Román J, Monforte V, Bravo C, López-Meseguer M, Montero M-Á, et al. Biomarkers of pulmonary rejection. *Transplant Proc*. noviembre de 2013;45(9):3163-9.
  78. Ross DJ, Moudgil A, Bagga A, Toyoda M, Marchevsky AM, Kass RM, et al. Lung allograft dysfunction correlates with gamma-interferon gene expression in bronchoalveolar lavage. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. julio de 1999;18(7):627-36.
  79. Magnan A, Mege JL, Escallier JC, Brisse J, Capo C, Reynaud M, et al. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. *Marseille and Montréal Lung Transplantation Group. Am J Respir Crit Care Med*. abril de 1996;153(4 Pt 1):1431-6.
  80. Scholma J, Slebos DJ, Boezen HM, van den Berg JW, van der Bij W, de Boer WJ, et al. Eosinophilic granulocytes and interleukin-6 level in bronchoalveolar lavage fluid are associated with the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. diciembre de 2000;162(6):2221-5.
  81. Boehler A. The role of interleukin-10 in lung transplantation. *Transpl Immunol*. mayo de 2002;9(2-4):121-4.



82. Weigt SS, Derhovanessian A, Liao E, Hu S, Gregson AL, Kubak BM, et al. CXCR3 chemokine ligands during respiratory viral infections predict lung allograft dysfunction. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. febrero de 2012;12(2):477-84.
83. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP, Xue YY, Li K, et al. Critical role for CXCR3 chemokine biology in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 de julio de 2002;169(2):1037-49.
84. Agostini C, Calabrese F, Rea F, Facco M, Tosoni A, Loy M, et al. Cxcr3 and its ligand CXCL10 are expressed by inflammatory cells infiltrating lung allografts and mediate chemotaxis of T cells at sites of rejection. *Am J Pathol*. mayo de 2001;158(5):1703-11.
85. Husain S, Resende MR, Rajwans N, Zamel R, Pilewski JM, Crespo MM, et al. Elevated CXCL10 (IP-10) in bronchoalveolar lavage fluid is associated with acute cellular rejection after human lung transplantation. *Transplantation*. 15 de enero de 2014;97(1):90-7.
86. Neujahr DC, Perez SD, Mohammed A, Ulukpo O, Lawrence EC, Fernandez F, et al. Cumulative exposure to gamma interferon-dependent chemokines CXCL9 and CXCL10 correlates with worse outcome after lung transplant. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. febrero de 2012;12(2):438-46.
87. Weigt SS, Elashoff RM, Keane MP, Strieter RM, Gomperts BN, Xue YY, et al. Altered Levels of CC Chemokines During Pulmonary CMV Predict BOS and Mortality Post-Lung Transplantation: CC Chemokines During CMV Post-Lung Transplant. *Am J Transplant*. julio de 2008;8(7):1512-22.
88. El-Gamel A, Sim E, Hasleton P, Hutchinson J, Yonan N, Egan J, et al. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and obliterative bronchiolitis following pulmonary transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. septiembre de 1999;18(9):828-37.
89. Espirometria. Normativa SEPAR (2013).
90. Danel C, Israël-Biet D, Costabel U, Klech H. Therapeutic applications of bronchoalveolar lavage. *Eur Respir J*. noviembre de 1992;5(10):1173-5.
91. Gottlieb J, Szangolies J, Koehnlein T, Golpon H, Simon A, Welte T. Long-term azithromycin for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*. 15 de enero de 2008;85(1):36-41.
92. Gerhardt SG, McDyer JF, Girgis RE, Conte JV, Yang SC, Orens JB. Maintenance azithromycin therapy for bronchiolitis obliterans syndrome: results of a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1 de julio de 2003;168(1):121-5.
93. Yates B, Murphy DM, Forrest IA, Ward C, Rutherford RM, Fisher AJ, et al. Azithromycin reverses airflow obstruction in established bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 15 de septiembre de 2005;172(6):772-5.

94. Vanaudenaerde BM, Meyts I, Vos R, Geudens N, De Wever W, Verbeken EK, et al. A dichotomy in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation revealed by azithromycin therapy. *Eur Respir J*. octubre de 2008;32(4):832-43.
95. Vanaudenaerde BM, Vos R, Meyts I, De Vleeschauwer SI, Verleden SE, Widyastuti-Willems A, et al. Macrolide therapy targets a specific phenotype in respiratory medicine: from clinical experience to basic science and back. *Inflamm Allergy Drug Targets*. diciembre de 2008;7(4):279-87.
96. Greer M, Dierich M, De Wall C, Suhling H, Rademacher J, Welte T, et al. Phenotyping established chronic lung allograft dysfunction predicts extracorporeal photopheresis response in lung transplant patients. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. abril de 2013;13(4):911-8.
97. Paradis I. Bronchiolitis obliterans: pathogenesis, prevention, and management. *Am J Med Sci*. marzo de 1998;315(3):161-78.
98. Akdis M, Burgler S, Cramer R, Eiwegger T, Fujita H, Gomez E, et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- $\gamma$ : receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. marzo de 2011;127(3):701-721.e1-70.
99. Verleden SE, Scheers H, Nawrot TS, Vos R, Fierens F, Geenens R, et al. Lymphocytic bronchiolitis after lung transplantation is associated with daily changes in air pollution. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transpl Surg*. julio de 2012;12(7):1831-8.
100. Proud D, Leigh R. Epithelial cells and airway diseases. *Immunol Rev*. julio de 2011;242(1):186-204.
101. Belperio JA, Burdick MD, Keane MP, Xue YY, Lynch JP, Daugherty BL, et al. The role of the CC chemokine, RANTES, in acute lung allograft rejection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1 de julio de 2000;165(1):461-72.
102. Zheng HX, Burckart GJ, McCurry K, Webber S, Ristich J, Iacono A, et al. Interleukin-10 production genotype protects against acute persistent rejection after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. mayo de 2004;23(5):541-6.

---

***ANEXOS***

---

**UTILIDAD CLÍNICA DEL ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS Y LAS CITOQUINAS EN EL  
LAVADO BRONCOALVEOLAR  
DE PACIENTES CON DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO PULMONAR**

**ANEXO I : HOJA DE INFORMACIÓN DEL PACIENTE Y MODELO DE  
CONSENTIMIENTO POR ESCRITO**

El pulmón trasplantado es un órgano que puede sufrir episodios de rechazo agudo, rechazo crónico e infecciones. Actualmente el único método para el diagnóstico de estas alteraciones es la broncoscopia con toma de muestras de las secreciones bronquiales y biopsia de pequeños fragmentos de pulmón.

Le proponemos que participe en un estudio que tiene como objetivo analizar las secreciones respiratorias tomadas para detectar sustancias que nos pueden indicar la existencia de infección o rechazo en el órgano trasplantado, sin necesidad de biopsia.

Este procedimiento no supone ninguna prueba adicional en el seguimiento rutinario de su trasplante.

A pesar de ello, en todo momento usted puede retirarse del estudio sin tener que dar explicaciones sobre el motivo.

Los datos que se obtengan en estas exploraciones pueden ser publicadas aunque se le garantiza la confidencialidad.

Le solicitamos su consentimiento para determinar los niveles de interleucinas en muestras respiratorias el día que se tenga que realizar una broncoscopia, por indicación clínica. Esto no supone ningún tipo de exploración, ni molestia adicional.

Yo, .....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con Dr. ....

Comprendo mi participación voluntaria en el estudio.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1/ Cuando quiera

2/ Sin tener que dar explicaciones.

3/ Sin que repercuta en mis cuidados médicos en caso de retirarme

Presto libre conformidad para participar en el estudio.

Firma del paciente:

Fecha:

Firma del médico:

Fecha:

**UTILIDAD CLÍNICA DEL ANÁLISIS DE LAS CÉLULAS Y LAS CITOQUINAS EN EL  
LAVADO BRONCOALVEOLAR  
DE PACIENTES CON DISFUNCIÓN CRÓNICA DEL INJERTO PULMONAR**

**ANEXO II : HOJA DE RECOGIDA DE DATOS**

- Nombre:
- 
- NHC:
- 
- Fecha de nacimiento:
- 
- Sexo:
- 
- Enf. Base:
- 
- Fecha trasplante:
- 
- Tipo de trasplante:
- Complicaciones postrasplante: Rechazo agudo: no-----sí  
Infecciones: no-----sí (especificar)
- BOS: no-----sí (fecha: )
- Tratamiento con ITOR: no-----sí (fecha de inicio
- Tratamiento con linfoglobulina/timo: no---sí (fecha de inicio:
- Fecha broncoscopia, código:
- Causa de realización de broncoscopio: caída de flujos- fiebre-  
protocolizada- otro
- Tratamiento en el momento broncoscopio:
- Resultados broncoscopio: BTB:  
  
Cultivos bacterias BAS/BAL:  
Cultivos hongo BAS/BAL:  
Shell vial del BAL:  
Secreciones purulentas: no---sí
- Valores de células:

Macrófagos

Linfocitos (Subtipos)

Neutrófilos

- Valores de Interleucinas:

IL-6:

IL-8:

IL-4:

IL-10

TNF:

IL-2:

MCP-1:

RANTES:

MIG/CXCL9

IP-10/CXCL10.